

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Ursula Ilo

**Vastsündinute laiendatud skriining kaasasündinud ainevahetushaiguste suhtes
tandem mass-spektromeetria meetodil**

Magistritöö

Juhendajad:

Katrin Õunap, M.D., Ph.D

Kadi Künnapas, MSc

Karit Reinson M.D.

Neeme Tõnisson, M.D., Ph.D

TARTU 2015

SISUKORD

| | |
|--|----|
| KASUTATUD LÜHENDID..... | 4 |
| SISSEJUHATUS..... | 5 |
| 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE..... | 6 |
| 1.1. Kaasasündinud ainevahetushaigused..... | 6 |
| 1.2. Vastsündinute sõeltestimine..... | 8 |
| 1.2.1. Sõeltestimise definitsioon ja kriteeriumid..... | 8 |
| 1.2.2. VS meetodite ajalooline ülevaade..... | 9 |
| 1.2.3. MS/MS sõeltestimises..... | 10 |
| 1.2.3.1. VS MS/MS meetodi tööpõhimõte..... | 11 |
| 1.2.3.2. Ioonide skaneerimise võtted..... | 12 |
| 1.2.4. MS/MS metoodika eelised ja piirangud..... | 13 |
| 1.2.5. Tehnoloogia mõju VS põhimõtetele..... | 15 |
| 1.3. MS/MS metoodikal põhineva skriiningu protokollide varieerumine..... | 16 |
| 1.3.1. Proovide derivatiseerimine..... | 16 |
| 1.3.2. Suktsinüülatseooni analüüs I tüüpi türosineemia identifitseerimiseks..... | 17 |
| 1.4. Erinevate riikide kogemus laiendatud VS-l..... | 18 |
| 1.5. Rahvusvaheline koostöö..... | 20 |
| 1.6. Sõeltestimise efektiivsus ja eetika..... | 21 |
| 1.7. Sõeltestimine Eestis..... | 22 |
| 2. EKSPERIMENTAALOSA..... | 24 |
| 2.1. Töö eesmärgid..... | 24 |
| 2.2. Materjal ja metoodika..... | 24 |
| 2.2.1. Proovid..... | 24 |
| 2.2.2. Tarvikud, kemikaalid ja aparatuur..... | 24 |
| 2.2.3. Proovide ettevalmistus..... | 25 |
| 2.2.4. UPLC-MS/MS süsteem..... | 26 |
| 2.2.5. Verifitseerimine ja kvaliteedikontroll..... | 28 |
| 2.2.6. Võrdluskatsete läbiviimine ja interpretatsioon..... | 29 |
| 2.2.7. Protsentiilide arvutamine..... | 30 |
| 2.2.8. Eetika..... | 30 |

| | |
|---|----|
| 2.3. Tulemused..... | 30 |
| 2.3.1. Meetodi verifitseerimine..... | 31 |
| 2.3.2. Võrdluskatsete interpretatsioon..... | 31 |
| 2.3.3. Metaboliitide otsusepiiride määramine..... | 35 |
| 2.3.4. Pilootprojekti koondtulemused..... | 37 |
| 2.4. Arutelu..... | 38 |
| KOKKUVÕTE..... | 43 |
| SUMMARY..... | 44 |
| TÄNUAVALDUSED..... | 46 |
| KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU..... | 47 |
| LISA 1..... | 55 |
| LISA 2..... | 56 |
| LISA 3..... | 58 |
| LIHTLITSENTS..... | 60 |

KASUTATUD LÜHENDID

ACMG – *American College of Medical Genetics*

CPT I – karnitiin palmitoüültransferaas puudulikkus tüüp I (*carnitine palmitoyltransferase deficiency type I*)

ERNDIM - väline kvaliteedi kontrolli süsteem (*European Research Network for Evaluation and Improvement of Screening, Diagnosis and Treatment of Inherited Disorders of Metabolism*)

GC – gaasikromatograafia (*gas chromatography*)

CH – kaasasündinud hüpotüreooos (*congenital hypothyroidism*)

FPR – valepositiivsete tulemuste osakaal (*false positive rate*)

HCU – homotsüsteinuuria (*homocystinuria*)

LC – vedelik-kromatograafia (*liquid chromatography*)

MCAD – keskmise ahelaga atsüül-CoA dehüdrogenaasi puudulikkus (*medium chain CoA-dehydrogenase deficiency*)

MMA – metüülmalonaatatsiduuria (*methylmalonic acidemia*)

MS/MS – tandem mass-spektromeetria (*tandem mass spectrometry*)

MSUD - vahtrasiirupitõbi (*maple syrup urine disease*)

MRM – *multiple reaction monitoring*

NL – *neutral loss scan*

PKU – fenüülketonuuria (*phenylketonuria*)

PPA – propionaatatsiduuria (*propionic acidemia*)

PPV – positiivne ennustav väärtus (*positive predictive value*)

R4S – rahvusvaheline Mayo kliiniku hallatav koostööprojekt (*Region 4 Stork*)

SucA – suksinüülatsetoon

TYR I – I tüüpi türosineemia (*tyrosinemia type I*)

VLCAD – väga pika ahelaga atsüül-CoA dehüdrogenaasi puudulikkus (*very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*)

VS – vastasündinute skriining

SISSEJUHATUS

Kaasasündinud ainevahetushaigused on rühm pärilikke haigusi, mille korral esineb organismis spetsiifiline biokeemiline kõrvalekalle, mis põhjustab raskeid metabolismi häireid. Haigused võivad avalduda juba vastsündinu eas, aga ka täiskasvanutel, ning tekitada arengule pöördumatut kahju. Haiguste kliiniline pilt on väga varieeruv ning mõjutatud võivad olla mitmed organid ja organsüsteemid (Blau *et al.*, 2006).

Mitmete haiguste jaoks on kättesaadavad ravimeetodid, mis ennetavad püsivate kahjude teket, kui haigus avastatakse piisavalt varakult. Selliste patsientide avastamiseks on välja töötatud populatsioonipõhine vastsündinute sõeltestimine ehk skriining (VS) – esimestel elupäevadel teostatav testimine mitmesuguste kaasasündinud haiguste suhtes. Skriiningu eesmärk on tagada patsientidele ravi alustamine haiguse asümptomaatilises või varases perioodis.

Isegi kui sõeltestitavad ainevahetushaigused on äärmiselt harvaesinevad, siis varase avastamise ning ravi alustamisega suudetakse vähendada koormust patsientidele ja meditsiinisüsteemile tervikuna (Venditti *et al.*, 2003).

Alates 1960-ndatest aastatest on arendatud analüütilisi meetodeid, et identifitseerida vastsündinute verest spetsiifiliste metaboliitide või hormoonide kõrvalekaldeid usaldusväärselt ning kulutõhusalt. Kuni 1990-ndate aastateni kehtis juurutatud sõeltestimise programmides põhimõte „üks analüüs – üks metaboliit – üks haigus“, kuid tänu tandem mass-spektromeetria (MS/MS) meetodi jõulisele arengule on täna võimalik testida vastsündinuid ühe analüüsi abil kümnete erinevate haigusseisundite suhtes. See on võimaldanud kliinilises laboris töösse rakendada laiendatud skriiningu programmid (Chace, 2003).

Käesolev magistritöö annab ülevaate vastsündinute sõeltestimise ajaloost, MS/MS metoodika rakendamisest vastsündinute sõeltestimisel, meetodite täiustumisest ning juurutatud sõeltestimise programmide erinevates riikides. Uurimustöö eksperimentaalne eesmärk on hinnata laiendatud VS meetodi töökindlust laborisest ja -välise kvaliteedi kontrolli analüüsides alusel, selgitada välja Eesti populatsiooni haiguslikele kõrvalekalletele iseloomulikud metaboliitide otsusepiirid ja anda ülevaade pilootprojekti koondtulemustest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

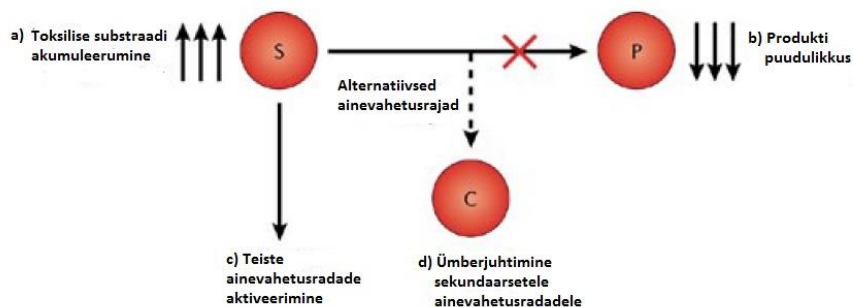
1.1. Kaasasündinud ainevahetushaigused

Metabolism on terviklik elusorganismis toimuvate reaktsioonide kogum. Kaasasündinud ainevahetushaigused on geneetilised häired, mida põhjustab kindla keemilise reaktsiooni kõrvalekalle ainevahetusrajas (Lanpher *et al.*, 2006). Esimesena formuleeris mõiste „kaasasündinud ainevahetushaigused“ Archibald Garrod kirjeldamaks geneetiliselt determineeritud haigusseisundeid nagu alkaptonuuria, albinism ja tsüstinoouria (Garrod, 1908).

Ehkki iga ainevahetushaigus eraldiseisvalt on harvaesinev, on tervikuna haiguste grupi üldine esinemissagedus märgatavalt suurem. Erinevate allikate alusel on haiguste esinemissagedus keskmiselt 1:2907 vastsündinu kohta (Lindner *et al.*, 2011) kuni 1:2500 (Applegarth *et al.*, 2000).

Kaasasündinud ainevahetushaigusi saab klassifitseerida sõltuvalt mõjutatud organist või organsüsteemist; mõjutatud raku organelli järgi (mitokondriaalsed, peroksüsomaalsed, lüsosomaalsed) või patsiendi vanuse järgi sümptomite kujunemisel (neonataalsed, lapsea ja täiskasvanueas avalduvad haigused). Kuna erinevad lähenemised on informatiivsed, siis ühtset ja universaalset klassifikatsiooni ei eksisteeri (Lanpher *et al.*, 2006). Levinud klassifikatsiooni süsteem jagab ainevahetushaigused kaheks gruppiks, sõltuvalt sellest, kas haaratud on suured või väikesed molekulid. Antud klassifikatsioon hõlmab nii haiguse patofüsioloogiat, kliinilist pilti kui ka raviplaani (Applegarth *et al.*, 1989).

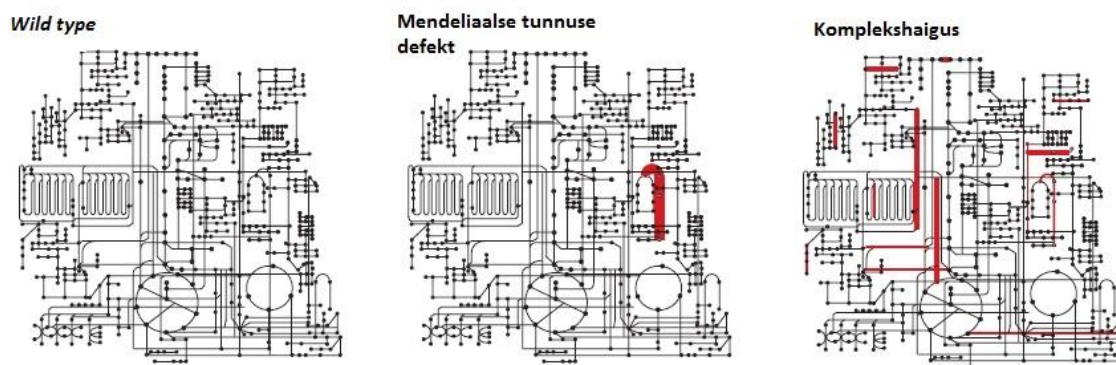
Kaasasündinud ainevahetushaiguste patogeneesi saab kirjeldada kui funktsiooni kadu või lisandumist, mida põhjustavad mutantsed valgud (enamasti ensüümi või transporteri funktsionaalsusega). Haiguste grupi geneetiline taust on heterogeenne ning võib tuleneda nii ühest kui mitmest punktmutatsioonist, deletsioonist, insertioonist või genoomi ümberkorraldustest, mis võivad esineda nii kodeerivates kui regulatoorsetes järjestustes (Lanpher *et al.*, 2006). Ainevahetushaigusi põhjustavate mutatsioonide bioloogilisi efekte iseloomustavad neli peamist protsessi on kujutatud joonisel 1.



Joonis 1. Ainevahetushaiguste patogeneesi mehhanism. Ensümaatilise blokaadi efekti tulemuseks on: a) otsene toksilise üleneva substraadi akumulatsioon (S); b) alaneva produkti (substraadi) defitsiit (P); c) alternatiivsete radade aktiveerimine ja alternatiivse tee metaboliitide (C) tootmine (Lanpher *et al.*, 2006 järgi).

Ainevahetushaigusi põhjustavad kõrvalekalded avalduvad metaboliitide kuhjumise, transporthäire või energiadefitsiidina, mis põhjustavad erinevaid tervisehädaid. Esmaseks kliiniliseks avaldumiseks võib olla näiteks elundite arengu häired, vaimse arengu mahajäämus, psüühikahäired, äkksurm jm. Sageli on esmased sümptomid mittespetsiifilised ning seetõttu on õigeaegne diagnoosimine ja ravi keeruline. Ravi hilinenud alustamisega pole alati võimalik tekkinud kahjustusi olematuks muuta (Blau *et al.*, 2006).

Kaasasündinud ainevahetushaigused võivad olla pleiotroopsed ning mõjutada kõiki organeid ja organsüsteeme. Traditsiooniliselt on kaasasündinud ainevahetushaigustega seotud mutatsioone peetud klassikalisteks Mendeli seaduste alusel päranduvateks tunnusteks, kus iga haigusseisundit põhjustab mutatsioon kindlas geenis. Tänu teadmiste avardumisele ainevahetushaiguste patogeneesi protsesside kohta, on järjest enam informatsiooni, et teatud juhtudel on haigusseisundite puhul tegemist komplekssete geenide ja keskkonna vaheliste interaktsioonidega ning geenide ja toitainete vaheliste interaktsioonidega, mis põhjustavad patsiendil komplekshaigusi (Dipple ja McCabe, 2000).



Joonis 2. Kaasasündinud ainevahetushaigused ja metaboolsed võrgustikud. Kõrvalekaldega ainevahetusrajad on märgitud punaselt ja mõju ulatust iseloomustab joone tugevus. Klassikaliste kaasasündinud ainevahetushaiguste puhul on tugevalt mõjutatud primaarne ainevahetusrada. Komplekshaiguste korral on mõjutatud mitu ainevahetusrada üheaegselt. (Lanpher *et al.*, 2006 järgi).

1.2. Vastsündinute sõeltestimine

1.2.1. Sõeltestimise definitsioon ja kriteeriumid

Vastsündinute sõeltestimine ehk skriining on esimestel elupäevadel teostatav testimine mitmesuguste kaasasündinud haiguste suhtes, et tagada patsientidele ravi alustamine haiguse asümptomaatilises või varases perioodis.¹ Positiivse testi tulemusega kaasnevad VS programmis kliinilist leidu kinnitavad analüüsid (ensümaatilised ja/või molekulaarsed) ning perekonna geneetiline nõustamine.

Populatsioonipõhise sõeltestimise läbiviimise põhimõtted formuleerisid 1968. aastal Wilson ja Junger (Wilson ja Junger, 1968) ning nendest juhindub ka Maailma Tervishoiuorganisatsioon. Kriteeriumide eesmärk on tagada, et sõeluuringu programm oleks efektiivne ja kasulik nii indiviidile kui ka ühiskonnale laiemalt.

Tabel 1. Sõeltestimise kriteeriumid Wilsoni ja Jungeri järgi.

1. Testitav haigus peab olema tõsine terviseprobleem ning põhjustama patsiendi tervise olulist halvenemist või enneaegset surma.
2. Diagnoositud patsientidele peab leiduma aktsepteeritav ravimeetod, mis parandab haiguse loomulikku kulgu.
3. Diagnoosimiseks ja ravimiseks on kättesaadavad vajalikud oskused ja vahendid.
4. Haiguse patogeneesi protsessis peab esinema latentne või varane sümptomaatiline periood, mis on äratuntav või testimisel tuvastatav.
5. Välja on töötatud sobiv testimise või uuringu metoodika, mis on tundlik ja ohutu.
6. Testimine on kättesaadav ning seda saab kohandada populatsioonile.
7. Haiguse loomulik kulg ja progressioon on täpselt teada.
8. Peavad olema selged kriteeriumid, mille alusel patsiente diagnoosida ja ravida.
9. Sõeltestimine ja leitud haigusjuhu kinnitamine (sh diagnoosi kinnitavad uuringud ja ravi) on tervishoiusüsteemile tervikuna kulutõhus.
10. Sõeltestimine ei tohiks olla ühekordne projekt, vaid pidev protsess.

Kuna neile kriteeriumitele on täielikult vastanud vaid vähesed analüüsid ja haigused, siis kogu populatsiooni hõlmavad programmid, sh VS, on ajalooliselt olnud suunatud vaid väheste haiguste diagnoosimiseks (Rousseau *et al.*, 2012). Riigiti on testitavate haiguste arv erinev ning

¹ <http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=newbornscreening>

põhineb peamiselt tervishoiuvaldkonnas kasude ning riskide suhte hinnangutel (Chace *et al.*, 2003).

VS on oluline, sest võimaldab identifitseerida pealtnäha terved imikud, kellel esinevad tõsised pärilikud, tihti ainevahetuse kõrvalekalletega seotud haigused. Neid haigusi saab dieetravi ja ravimite manustamisega ravida enne, kui kaasneb tõsine haigestumine või suremus (Abhyankar *et al.*, 2010). On väidetud, et VS programmide näol on tegemist ühe olulisema laste tervist parandava meetmega viimase sajandi jooksul (Carlson, 2004). Laiendatud sõeltestimisel on võimalik ühe testiga identifitseerida erinevaid haigusi ning seeläbi ennetada tõsiseid tagajärgi (Wilcken, 2010; Waisbren, 2008).

1.2.2. VS meetodite ajalooline ülevaade

Üleüldine vastsündinute kaasasündinud ainevahetushaiguste sõeltestimine algas 1960-ndatel aastatel, kui Guthrie ja Susi arendasid välja bakteriaalse inhibitsiooni analüüsi meetodi hindamiseks fenüülalaniini väärtust filterpaberile kogutud vereproovidest, mida tuntakse ka „*Guthrie testi*“ nime all (Guthrie ja Susi, 1963). Antud meetod tõi meditsiinipraktikasse testimise fenüülketonuuria (PKU) suhtes ning võimaldas vältida neuroloogilise arengu probleeme, mis esinesid ravita jäänud patsientidel. Meetod oli nii tõhus ja töökindel, et USA-s jt. arenenud riikides hakati kiirelt kõiki vastsündinuid testima esimestel elupäevadel (Paul, 1997). Tänapäevaks on PKU klassikaline näide hästitöötavast sõeltestimise praktikast, mis on laialt aktsepteeritud ning muutunud standardravi osaks kõikides arenenud riikides (Lehotay *et al.*, 2011).

Guthrie töö tulemusel arendati testimise metoodikad ka galaktoseemia, vahtrasiirupi tõve (MSUD) ja homotsüteinuuria (HCU) testimiseks.

1970-ndatel kui arendati immuunanalüüsid türoksiini ja kilpnääret stimuleeriva hormooni (TSH) mõõtmiseks, hakati vastsündinuid testima ka kaasasündinud hüpotüreooosi (CH) suhtes. Et muuta sõeltestimine efektiivsemaks, üritati arendada teste, mis võimaldaks ühe analüüsi põhjal identifitseerida erinevaid haigusi. Selleks prooviti välja töötada kromatograafilisi meetodeid bakteriaalsete analüüsides asemel (Efron *et al.*, 1964; Scriver *et al.*, 1964). Kuid paberkromatograafia ei olnud siiski piisavalt tundlik. Tundlikkuse tõstmiseks ja testitavate haiguste spektri laiendamiseks võeti kasutusele õhukese kihi kromatograafia, mille abil analüüsiti vastsündinute uriiniproove (Levy *et al.*, 1980). Kuid uriini kasutamisel esinesid analüütilised piirangud: esiteks vajas analüüs lisa proovimaterjali, sest uriini põhjal ei olnud võimalik identifitseerida PKU-d ja CH-d, mis olid vastsündinute skriiningu programmide

olulised komponendid. Teiseks pidi uriiniproovi koguma lapsevanem või arst pärast sünnitusmajast lahkumist, mis tekitas programmi juurutamises logistilisi probleeme. Kolmandaks varieerub uriini kontsentratsioon suurtes piirides ning põhjustab valepositiivseid ja valenegatiivseid tulemusi. Esimesed põhjustavad mittevajalikke lisaanalüüse ja teised jätavad patsiendil haiguse identifitseerimata. Lisaks on mitu uriinist diagnoositavat haigust kliiniliselt kahjutud (Levy *et al.*, 1980). Sõeltestimine jätkus põhimõttel „üks test – üks haigus“ (Levy, 1998).

Sõeltestimise algusest lisati VS paneelidesse üksikuid uusi haigusi. Mitmed riigid on sõeltestimise paneelidesse veelgi lisanud kaasasündinud ainevahetushaigusi: galaktoseemia, tsüstiline fibroos, kongenitaalne adrenaalne hüperplaasia ja türosineemia (Pitt, 2010). Laiendatud testimist pidurdas eelkõige asjaolu, et iga konkreetse haiguse diagnoosimine vajab spetsiaalse meetodi väljatöötamist ning analüüsi eraldi teostamist, mis muutis testimise aja- ja töömahukaks (Paul, 2008). Hinnanguliselt testitakse praegu umbes 25% kõikidest vastsündinutest maailmas vähemalt CH suhtes (Wilcken, 2007). Paljudki haigused on olnud skriiningu programmide kandidaadid, kuid kõikide haiguste jaoks ei ole testimine praktiline (Pitt, 2010).

1.2.3. MS/MS sõeltestimises

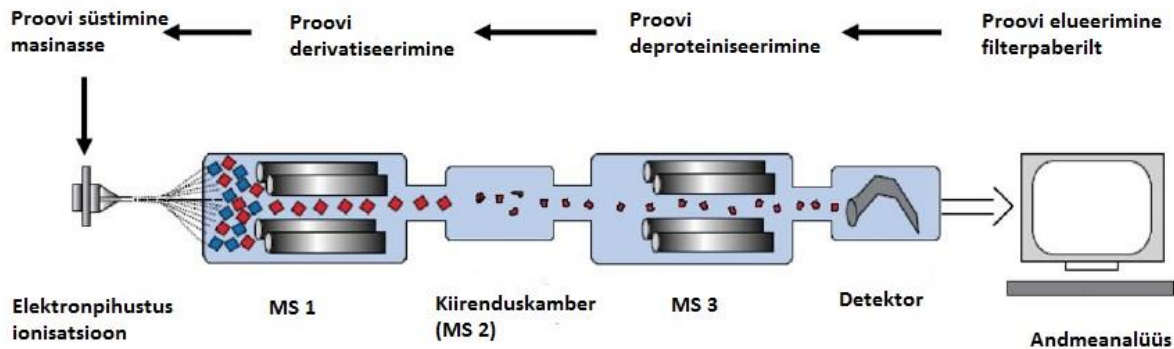
MS/MS võeti kliinilistes laborites kasutusele 1980-ndatel aastatel (Garg ja Dasouki, 2006). 1990-ndatel aastatel kirjeldasid Millington, Roe ja kolleegid MS/MS metoodika potentsiaalset sobivust mitmete analüütide samaaegseks testimiseks vereplekkidest VS programmides. Peatselt näidati uue meetodi praktilist väärtust kaasasündinud ainevahetushaiguste diagnoosimisel (Chace *et al.*, 1993 ja 1995; Rashed *et al.*, 1995; Ziadeh *et al.*, 1995). Algne meetod sisaldas tehnilisi piiranguid, mis puudutasid läbilaskevõimet, sest puudus piisav automatiseeritus (Pollitt, 2006). Laboriprotsessi lihtsustasid biomolekulide elektronpihustusmeetodil ioniseerimine, kommertsiaalselt arendatud robustsed ning kergelt puhastatavad ioonisatsiooni allikad ning andmete analüüsimise automatiseeritud süsteemid (Rashed *et al.*, 1995; Pollitt, 2006).

MS/MS tehnoloogia sobib skriiningu programmides kasutamiseks, sest meetod võimaldab erinevate analüütide samaaegset analüüsimist, tagab suure läbilaskevõime (2-3 minutit proovi kohta) ja madalad reagentide kulud laborile. MS/MS meetod on ka äärmiselt tundlik ja spetsiifiline (Chace, 2009).

Fundamentaalsed arengud MS/MS metoodikas metaboliitide analüüsiks, mis juurutati 1990-ndate alguses, on kasutusel tänaseni. Enam kui kakskümmend aastat ioniseerimise tehnikate, protsessi automatiseerimise ja andmete analüüsi täiustamist on võimaldanud vastsündinute sõeltestimise mahtusid suurendada käputäiest patsientidest kuni mitme tuhande proovini päevas (Chace *et al.*, 2003).

1.2.3.1. VS MS/MS meetodi tööpõhimõte

Enne MS/MS masinasse süstimist analüüdid ekstraheeritakse vereplekkidest ning derivatiseeritakse, et tõsta analüüsi tundlikkust ja spetsiifilisust. VS-s kasutatakse butanooliga derivatiseerimist, kus moodustuvad aminohapete, orgaaniliste hapete ja atsüülkarnitiinide butüülestrid (proovide derivatiseerimist käsitleb täpsemalt kirjanduse ülevaate alalõik 1.3.1.). MS/MS meetod on piisavalt kiire, tundlik ning spetsiifiline, et VS puhul kromatograafilist eraldamist analüütilisel kolonnil ei toimu. Enamasti kasutatakse kapillaari või väiksest kolonni, millega saadakse piisavalt lai proovi piik, et teostada kõik vajalikud mõõtmised. Massispektromeetriliseks analüüsiks peavad analüüsitavad ühendid olema gaasifaasis laetud olekus. Selle saavutamiseks kasutatakse elektropihusutsionisatsiooni (*electrospray ionization*) meetodit: proov pihustatakse lämmastikuvoos ning pihusti ja MS-i sisendi vahel rakendatakse suur potentsiaalide erinevus. Tulemusena tekivad laetud tilgad, mis suunatakse massispektromeetrisse. Tilgad kuivatatakse ning järgi jäänud laetud analüüdi molekulid suunatakse esimesse kvadrupool tüüpi massifiltrisse. Filtri läbivad vaid kindlad, huvitava massi ja laengu suhtega ioonid nn. eellasioonid. Need suunatakse edasi kollisioonirakku, kus toimub eellasioonide lõhkumine väiksemateks tükkideks – fragmenteerimine. Laetud molekulid põrgatatakse vastu inertgaasi (N₂, Ar, He) molekule, mille tulemusel molekulid lagunevad väiksemateks molekulile iseloomulikeks tükkideks - tütarioonideks. Laetud iseloomulikud fragmendid juhatakse edasi teise massifiltrisse, mida läbivate ionide hulk detekteeritakse. Detektorilt saadav signaali intensiivsus on aluseks ühendi sisalduse määramisel (Garg ja Dasouki, 2006). MS/MS analüüsi põhimõtet illustreerib joonis 3.

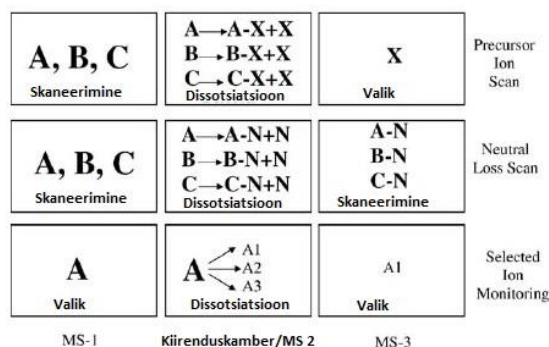


Joonis 3. MS/MS metoodikal põhineva sõeltestimise protsessi skeem. Proov valmistatakse ette ning süstitakse MS/MS-i. MS-1 eraldab ioonid nende massi ja laengu suhte alusel (m/z). Valitud ioonid viiakse kiirenduskambrisse (MS-2, mis on samuti mass-spektromeeter, kus esineb inertse gaasi vool kokkupõrgete indutseerimiseks), kus toimub kindlate ionide fragmenteerumine. MS-3 eraldab fragmenteerunud ioonid ning suunab nad detektorisse. Andmeanalüüs hõlmab ionide identifitseerimist, kvantifitseerimist ja kõrvalekalletega tulemuste märkimist (Garg ja Dasouki, 2011 järgi).

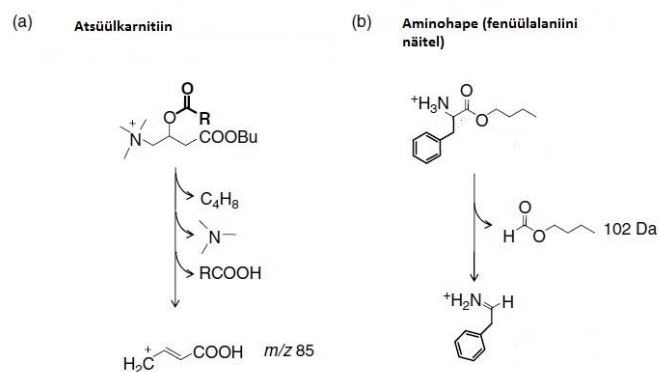
1.2.3.2. Ioonide skaneerimise võtted

Sõltuvalt teostatavast analüüsist saab MS/MS kasutada mitmes erinevas skaneerimise režiimis:

(1) *Precursor ion scan* detekteerib kõik eellasioonid, mis tekitavad ühetaolise fragmendi, (2) *Neutral loss scan* (NL) detekteerib kõik eellasioonid, mis kaotavad fragmentatsiooni ühesuguse molekuliosa. Skaneerimise võtted, mida kasutatakse vastsündinute laiendatud skriiningus MS/MS meetodil, on skemaatiliselt kujutatud joonisel 4 ja atsüülkarnitiinide ning α -aminohapete puhul reaktsioonina joonisel 5 (Garg ja Dasouki, 2006).



Joonis 4. Erinevate MS/MS skaneerimise režiimide skemaatiline kujutamine. *Precursor ion scan*: esimene mass-spektromeeter võimaldab valitud ionide (A, B, C) ülekandmise, kolmas mass-spektromeeter analüüsib spetsiifilist fragmentiooni (X), mis on moodustunud algselt valitud ionidest. Skaneerimist kasutatakse ühendite puhul, mis moodustavad ühesuguse fragmenteerunud iooni nagu atsüülkarnitiinid. *Neutral loss scan*: esimene ja kolmas mass-spektromeeter analüüsivad ioone, mis erinevad konkreetse massi ühiku poolest (võrdne neutraalse fragmendiga, N). Skaneerimist kasutatakse ühendite puhul, mis tekitavad ühesuguse neutraalse molekuli nagu α -aminohapped. *Selected Ion Monitoring*: kõik mass-spektromeetrid on staatilised ning analüüsivad ainult eelvalitud ioone (A, A1). Režiimi erivariant on *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), mis võimaldab ühe või mitmete erinevate eellasioonidele vastavate tütarioonide detekteerimist (Garg ja Dasouki, 2006 järgi).



Joonis 5. Kokkupõrkest indutseeritud atsüülkarnitiinide ja fenüülalaniini (α -aminohappe näide) butüülestri derivaatide dissotsiatsioon. Atsüülkarnitiinidele on iseloomulik ühesuguse fragmentiooni (m/z 85). moodustumine ning α -aminohapped kaotavad ühesuguse neutraalse fragmendi (102 Da) (Chace *et al.*, 2009 järgi).

Tervikliku aminohapete profiili määramiseks on vajalik kasutada erinevaid tüüpe skaneerimist. *Selected ion monitoring* tüüpi skaneerimine võimaldab optimeerida MS analüüsi parameetreid ning skaneerimise funktsioone, mis on vajalikud aminohapete detekteerimiseks, millel on erinev fragmenteerumise muster (näiteks arginiin, ornitiin, tsitrulliin), millel on kergelt fragmenteeruv funktsionaalne rühm (Chace *et al.*, 2005). Ornitiini ja tsitrulliini puhul kasutatakse NL 119 Da, (102 Da formaat + 17 Da ammoniaak), arginiini puhul NL 161 Da (Chace *et al.*, 2003). MS/MS meetod võimaldab kombineerida erinevaid skaneerimise võtteid, ei vaja sekundaarset süstimist masinasse ega proovide ettevalmistamise modifikatsioone. Tulemuseks on täielik atsüülkarnitiinide ja aminohapete profiil (Chace *et al.*, 2005).

1.2.4. MS/MS metoodika eelised ja piirangud

MS/MS tehnoloogia võimaldab VS-le uut lähenemist ning võimekust korraga testida enam kui kolmekümmend ainevahetushaigust ühe analüüsi käigus, väikesest vereproovist ning lihtsa protokolliga alusel (Chace *et al.*, 2003). Analüütide paralleelne mõõtmine on ka kliiniliselt efektiivne, sest ainevahetushaiguse diagnoosimisel tuleb korraga määrata rohkem kui ühte markerit, mis iseloomustab konkreetset haigust. Lisaks on võimalik määrata patsiendi täielik metaboolne profiil. Sellega kaasneb aga meetodi üks suuremaid puudusi – mõned MS/MS poolt detekteeritud kõrvalekalded võivad olla kliiniliselt kahjutud. See tõstatab eetilise küsimuse, kuidas labor ja arstid peaksid ümber käima informatsiooniga, millele ei ole kinnitatud kliinilist väärtust (Rhead *et al.*, 2002; Lehotay *et al.*, 2011).

Avaldatud andmetest selgub kindlalt, et MS/MS meetodil vastsündinute sõeltestimise läbiviimisel kaasneb kõrgem haigusjuhtude leidmise sagedus võrreldes kliiniliselt diagnoositud patsientidega. Mõne haiguse puhul on erinevus isegi kuni kahekordne (Grosse *et al.*, 2006;

Rhead, 2006; Wilcken *et al.*, 2007). Samuti varieerub mutatsioonide spekter skriiningul tuvastatud ja kliiniliselt diagnoositud patsientide vahel (Andresen *et al.*, 2001), mis muudab keeruliseks skriiningu tulemuste võrdlemise varem diagnoositud patsientidega (Wilcken, 2007).

Tehnoloogia analüütiline võimekus kõigi mõõdetavate analüütide osas ei ole ühtlane. Seega võib esineda osa oluliste haiguste puhul kõrgem valepositiivsete tulemuste osakaal (FPR) võrreldes traditsiooniliste meetoditega (Chace *et al.*, 2003). I tüüpi türosineemia (TYR I) identifitseerimisel viis see probleem mitme sekundaarse testi arendamiseni, mis algselt vajasid eraldi protokolle (Magera *et al.*, 2006; Sander *et al.*, 2006; la Marca *et al.*, 2008), kuid tänaseks on kombineeritud atsüülkarnitiinide ja aminohapete analüüsi protokoll (Metz *et al.*, 2011).

MS/MS limiteeriv faktor on ka diagnostilise dilemma tekkimine, kui üks või mitu markerit on seotud erinevate haigusseisunditega. Näiteks C5OH on väga tõsise haiguse, holokarboksülaasi süntaasi defitsiidi marker ning samuti üldiselt kahjutu kõrvalekalde, 3-metüülkrotonüül-CoA karboksülaasi puudulikkuse marker (Dantas *et al.*, 2005; Koeberl *et al.*, 2003). Metaboliitide kindlale haigusseisundile spetsiifilise vastavuse parandamiseks kasutatakse diagnoosimisel metaboliitide suhtarve. Paljud kliiniliselt tähenduslikud suhtarvud on kirjanduses avaldatud (ACMG, 2006; De Jesus *et al.*, 2010; Lehotay *et al.*, 2011). Diagnostilise probleemi lahenduseks kasutatakse haiguse identifitseerimisel primaarseid markereid ja metaboliitide suhete määramist, enamasti andmeanalüüsi meetoditega.

Sõeltestimise programmi tulemuslikkuse parameetrid sõltuvad paneeli lisatud testide otsusepiiridest (*cut-off* väärtused). Kui haiguse diagnoosimise lävi on liiga kõrge, jääb hulk vastsündinute haigusi avastamata. Kui lävi on aga liiga madal, tekib palju valepositiivseid tulemusi. Testitavate haiguste spekter on järjest laiem ning iga haigus eraldiseisvalt harvaesinev. Seega on järjest juurutatud ka sekundaarseid kinnitavaid teste, mis on komplekssemad, aeganõudvamad ega sobi kõrge läbilaskevõimega skriininguks, kuid on võimsuselt tundlikumad ja spetsiifilisemad. Sekundaarsete testide peamine eesmärk on vähendada FPR-i (Rousseau *et al.*, 2012).

USA andmetest lähtub, et peaaegu 100% tundlikkuse ning 99,6% spetsiifilisusega teostatud analüüsist MSUD suhtes leiti, et 1249-st algsest positiivsest tulemusest oli tõeliselt positiivne kõigest 18 vastsündinu tulemus (kokku testiti 3 364 612 vastsündinut) (*President's Council of Bioethics*, 2008). Seega on vastsündinute sõeltestimise protokollide oluline osa diagnostiliste kinnitavate analüüsides läbiviimine enne kliinilist sekkumist, et vältida mittevajalikku ravi. On

seatud ka analüütilised ja post-analüütilised eesmärgid laiendatud VS läbiviimisel MS/MS analüüsil: valepositiivsete tulemuste osakaal $<0.3\%$ ja positiivne ennustav väärtus (PPV) $>20\%$ (Rinaldo *et al.*, 2006). PPV on tõenäosus, et positiivse testi tulemuse korral on tegemist tõeliselt positiivse analüüsi tulemusega (tõeliste positiivsete tulemuste suhe valepositiivsete ja tõeliste positiivsete tulemuste summasse).

Piirangutest hoolimata on MS/MS meetodika juurutamine märkimisväärne samm VS programmides, millele tihti viidatakse ka kui paradigma muutusele (Rousseau *et al.*, 2012). Pikalt kehtinud arusaam „üks analüüt – üks analüüs – üks haigus“ asendus võimalusega testida ühel analüüsil enam kui 40 analüüti ning diagnoosida erinevaid harvaesinevaid haigusi samaaegselt.

1.2.5. Tehnoloogia arengu mõju sõeltestimise põhimõtetele

Üks põhilisi Wilsoni-Jungeri kriteeriume sätestas, et skriinitav haigus peab olema ravitav. Veel 10-15 aastat tagasi vastasid kõik laborites sõeluuritavad haigused täielikult kokku lepitud tingimustele. MS/MS tehnoloogia muutis võimalikuks testida tunduvalt rohkem haigusi, mis kõik ei vasta 100% formuleeritud kriteeriumidele. Eksisteerib selge lõhe tehnoloogilise võimekuse ning ekspertide, tervishoiu komiteede ja poliitikate kujundajate soovitude vahel. See lõhe on loonud vajaduse uuendada kriteeriume lähtuvalt skriinitava haiguse ravivõimalikkusele (Rousseau *et al.*, 2012). Aktsepteeritud ja efektiivse ravimeetodi olemasolu ei ole enam vajalik eeldus haiguse lisamiseks skriiningu paneeli, kui haigusjuhu identifitseerimine on oluline perekonna geneetilisel nõustamisel. Samuti on erinevaid tõlgendusi kriteeriumide punktide kohta, mis puudutavad tähtsa terviseprobleemi defineerimist ja piisavat haiguse loomuliku kulu mõistmist (Wilcken, 2003; Holtzman, 2003; Waisbren *et al.*, 2003).

2012. aastal sõnastas *American College of Medical Genetics* (ACMG) uued miinimumkriteeriumid, mille alusel lisada vastsündinute sõeltestimise programmi testitavaid haigusi:

- haigust saab identifitseerida 24-48 tunni jooksul pärast sündi ainevahetusuuringul, mitte arstliku läbivaatuse käigus;
- haiguse diagnoosimiseks on spetsiifiline ja tundlik meetodika:

- varane diagnoosimine, meditsiiniline sekkumine ning efektiivne ravi on tõestatud kasulikud.²

Ehkki riiklikud sõeltestimise programmid toetuvad endiselt Wilsoni ja Jungeri kriteeriumitele, on skriinimise põhimõtteid tehnoloogia täiustumise valguses üle vaadatud. Seni puudub süstemaatiline tulemuste hinnang (*President's Council of Bioethics*, 2008). Programmi efektiivsus, kvaliteedi kontroll ja tagamine ning tulemuste hindamine on täiendused, mida tuleb arvestada lisaks algselt püstitatud kriteeriumitele skriiningu programmi juurutamisel ja haiguste lisamisel paneeli (Andermann *et al.*, 2008; Linder *et al.*, 2011).

1.3. MS/MS metoodikal põhineva skriiningu protokollide varieeruvused

1.3.1. Proovide derivatiseerimine

Kaasasündinud ainevahetushaiguste suhtes vastasündinute sõeltestimise pre-analüütilises etapis valmistatakse proove ette kahel eri meetodil: kasutades või mitte kasutades proovide derivatiseerimist ehk butüülestriite moodustamist, mis muudab proovide ioniseerimise efektiivsemaks. Suurem osa laboreid kasutab derivatiseerimist, sest meetod on üldiselt tundlikum (Rousseau *et al.*, 2012). Derivatiseerimata proovide vabade hapete analüüs annab rohkem madalama ionide arvukusega tulemusi, (sõltuvalt ühendist kuni poole võrra). Derivatiseerimisel on kõrgem ionide arvukus, aga proovide ettevalmistamisel tuleb silmas pidada derivatiseerimise tingimusi: butüülestriite formeerumine toimub üldiselt happelises keskkonnas, mis võib aga põhjustada analüüsitavate atsüülkarnitiinide hüdrolyüüsi (Chace, 2003).

Tänu tundlikumatele uue põlvkonna MS/MS instrumentidele on proovide ettevalmistuse meetodid ilma derivatiseerimise etapita muutumas järjest populaarsemateks. Derivatiseerimata meetod lihtsustab proovide ettevalmistust, sest eemaldab metaboliitide butüleerimise toksilise ja söövitava reagendiga ja vähendab ettevalmistusaega. Suurema osa atsüülkarnitiinide ja aminohapete kvantitatiivsete tulemuste suhtes erinevad kaks meetodit omavahel vähem kui 15% (De Jesus *et al.*, 2010).

Suuremad erinevused tulemustes tekivad dikarboksüülatsüülkarnitiinide ühendite puhul, eriti lühikeste ahelate korral, näiteks glutarüülkarnitiin (C5DC). Loendusandmed on mitte-derivatiseeritud meetodi puhul tunduvalt väiksemad, ehkki kvantitatiivsed tulemused on

² <http://mchb.hrsa.gov/programs/newbornscreening/screeningreport.html>

sarnased. C5DC on oluline marker I tüüpi glutaaratsiduuria identifitseerimisel ning seega on tähtis tagada antud metaboliidi määramisel meetodi piisav tundlikkus (Rousseau *et al.*, 2012).

Uuemad ja tundlikumad MS/MS instrumendid võivad kompenseerida analüütide madalamaid väärtusi. Kuid mittederivateeritud proovide meetod võib indutseerida isobaariliste atsüülkarnitiinide puudulikkude eristamist ja suurendada FPR-i teatud haiguste diagnoosimisel. Lisaks peab modifitseerima ka vastavaid *cut-off* väärtusi (De Jesus *et al.*, 2010).

1.3.2. Suktsinüülatsetooni analüüs I tüüpi türosineemia identifitseerimiseks

Paljudes riikides kasutati TYR I diagnoosimiseks primaarse markerina türosiini, kuid analüüdi kõrge kontsentratsioon ei ole piisavalt tundlik, et tuvastada kõik haigusjuhtumid (Wilcken *et al.*, 2003).

Kõik vastsündinu TYR juhud ei ole seotud märkimisväärselt kõrge türosiini kontsentratsiooniga. Ainult türosiini analüüsil põhinevad meetodid, mille puhul proovid kogutakse teisel elupäeval, raporteerivad suurenenud hulgal valenegatiivseid tulemusi (la Marca *et al.*, 2008). Lisaks potentsiaalsetele valenegatiivsetele tulemustele esineb ka valepositiivseid tulemusi, mida tekitab kõrge türosiini tase neonataalse TYR levimus vastsündinute seas. Madala sünnikaaluga vastsündinutel võib türosiini tase olla kaks kuni kuus korda kõrgem kui teistel vastsündinutel (Denne *et al.*, 1996; la Marca *et al.*, 2008). Valenegatiivsete tulemuste peamine põhjus seisneb TYR I patsientide türosiini otsuseväärtusest madalamas tasemes, kuna türosiini tõus tekib alles siis, kui vastsündinul on juba välja kujunenud maksapuudulikkus (Frazier *et al.*, 2006; Wilcken *et al.*, 2003; la Marca *et al.*, 2008). Seega on leitud, et türosiini ei ole piisavalt tundlik ega spetsiifiline marker TYR I diagnoosimiseks (Chace *et al.*, 2003).

Mitu programmi on kasutusele võtnud suktsinüülatsetooni (SucA) mõõtmise kui usaldusväärse ja valideeritud markeri TYR I diagnoosimiseks (Allard *et al.*, 2004; Sander *et al.*, 2006; la Marca *et al.*, 2008; Turgeon *et al.*, 2008).

Kirjanduses on avaldatud erinevaid SucA analüüsimeetodeid, mis põhinevad metaboliidi kvantifitseerimisel eelnevalt aminohapete ja atsüülkarnitiinide analüüsiks ekstraheeritud vereplekkidest (Allard *et al.*, 2004; la Marca *et al.*, 2009). Need protokollid on üldiselt robustsed ning võrdlemisi lihtsad, kuid vajavad eraldi ekstraheerimise etappi, mis kahekordistab kas proovide ettevalmistamise või MS/MS analüüsi teostamise aega (la Marca *et al.*, 2011).

Turgeon ja kolleegid avaldasid meetodi SucA kombineeritud analüüsist koos aminohapete ja atsüülkarnitiindiega, mis põhines kaheastmelisel protokollil ühest vereplekist (Turgeon *et al.*, 2008). Esimesena ekstraheeritakse metanoolis aminohapped ja atsüülkarnitiinid, seejärel ekstraheeritakse SucA atsetonitriili:vee lahuses, mis sisaldab hüdrasiini. Vereplekkide teistkordsel ekstraheerimisel võib derivatiseerimata atsüülkarnitiine ja aminohappeid sisaldav 10-20% metanooli eluendi jääk analüüsi tulemusi mõjutada (Chace *et al.*, 2009). Meetodi parandamiseks ja optimeerimiseks lisati vereplekkide pesemise etapp ning juurutati ühekordse ekstraheerimisega meetod, milles üheaegselt ekstraheeritakse aminohapped ja atsüülkarnitiinid atsetonitriili:vee lahuses (Dhillon *et al.*, 2011). Kolm viimasena kirjeldatud protokoll ei vaja täiendatud MS/MS instrumente, kuid nende rakendamise puhul peab töötama hüdrasiini lahusega, mis on tervist kahjustav (Metz *et al.*, 2011).

Metz ja kolleegid avaldasid 2011. aastal valideeritud meetodi aminohapete, atsüülkarnitiinide ja SucA kombineeritud määramiseks. Proovide ettevalmistamine ei vajanud teistkordset analüüsi ega hüdrasiini kasutamist, selle asemel viidi SucA ohutumasse hüdrasooni lahusesse, mis derivatiseeriti. Antud meetodit iseloomustab tehniline täpsus rutiinsel kasutamisel ja kliinilisel hinnangul, mis võimaldab seda edukalt rakendada VS-l kaasasündinud ainevahetushaiguste suhtes (Metz *et al.*, 2011). Antud meetod on kasutusel ka SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabori geneetikakeskuses vastsündinute laiendatud skriiningu programmis.

1.4. Erinevate riikide kogemus laiendatud VS-l

VS kui rutiinne kliiniline tegevus jätkab laienemist kõikjal maailmas. Mitmed riigid testivad kõiki vastsündinuid PKU ja CH suhtes. Paljudes arenenud riikides sisaldavad testimispaneelid enam kui 20 erinevat ainevahetushaigust, mõnes riigis on laiendatud VS alles sissetöötamisel (Pourfarzam ja Zadhoush, 2013). 2007. aasta jaanuariks oli mitu Euroopa riiki juurutanud või läbi viinud pilootuuringud vastsündinute laiendatud sõeltestimiseks MS/MS meetodil (Bodamer *et al.*, 2007). Riiklike programmide algusaeg ning testitavate haiguste arv on toodud tabelis 2.

Haiguste paneelid, mida MS/MS meetodil testitakse, on riigiti erinevad ning peegeldavad erisusi potentsiaalsete riskide ja kasude hinnangutes, ehkki kõik programmid väidavad end tuginevat Wilsoni ja Jungeri kriteeriumitele. Riikide vahel on vähe konsensust küsimustes, mis haigusi paneeli lisada või kuidas reageerida kaasuvatele leidudele, mis ei kuulu paneelis määratavate haiguste hulka (Pollitt, 2007).

Tabel 2: Euroopa, Ameerika Ühendriikide ja Austraalia laiendatud skriiningprogrammide ülevaade

| Riik | Rahvaarv (2015) | Laiendatud skriiningu algus | Laborite arv | Testitavate haiguste arv | Viited ja kommentaarid |
|----------------------|------------------|-----------------------------|--------------|--------------------------------------|--|
| Austria | 8 224 038 | 2002 | 1 | 29 | Pollak ja Kasper, 2013; Loeber et al., 2012 |
| Belgia | 10 453 761 | | 3 | 11 (flaami) | |
| | | | 3 | 8 (prantsuse) | Loeber et al. 2012 |
| Eesti | 1 249 312 | 2015 | 1 | 19 | |
| Hispaania | 48 146 134 | 2001 | 20 | 27 | Loeber et al., 2012. <i>Regiooniti suured erinevused, riiklikku statistikat keeruline esitada.</i> |
| Holland | 16 947 904 | 2007 | 5 | 17 | Plass et al., 2010; Loeber et al., 2012 |
| Island | 319 395 | 2008 | 1 | 26 | Franzson, 2012 (konverentsietekanne); Loeber et al., 2012 |
| Norra | 5 207 689 | 2011 | 1 | 23 | Pettersen et al., 2012 |
| Portugal | 10 825 309 | 2004 | 1 | 25 | Vilarinho et al., 2010; Loeber et al., 2012 |
| Rootsi | 9 801 616 | 2011 | 1 | 24 | Engvall et al., 2012 |
| Saksamaa | 80 854 408 | 2001 | 11 | 12 | Lindner et al., 2011; Loeber et al., 2012 |
| Suurbritannia | 64 088 222 | 2004 | 16 | 6 | http://newbornbloodspot.screening.nhs.uk/imd |
| Šveits | 8 121 830 | | 1 | 7 | Loeber et al., 2012 |
| | | | | | http://www.novorozeneckyscreening.cz/en/for-the-public |
| | | | | | http://ldmp.upol.cz/newborns.php |
| Tšehhi | 10 644 276 | | 6 | 13 | Loeber et al., 2012 |
| Taani | 5 581 503 | 2009 | 1 | 12 | Lund et al., 2012 |
| Ungari | 9 897 541 | | 2 | 25 | Loeber et al., 2012 |
| Ameerika Ühendriigid | 321 362 789 | | | 29 (primaarset) 25 (sekundaarset) | ACMG, 2006. <i>Laiendatud skriiningprogrammide algusaeg varieerub osariikide lõikes. ACMG soovitusel testitavate haiguste kohta on üleriigiliselt tunnustatud.</i> |
| Austraalia | 22 751 014 | 1998 (New South Wales) | 5 | (vähemalt) 25 | Metcalfe, 2009; <i>Laiendatud skriiningprogrammide algusaeg ja haiguste arv varieerub osariikide ja territooriumide lõikes.</i> |

Rahvaarvu allikas: <http://www.census.gov/population/international/data/idb/rank.php>

Austraalias testitakse kõiki MS/MS meetodil määratavaid haigusseisundeid, teatavad erinevused esinevad osariikide lõikes, kuid igal pool on paneelis vähemalt 25 ainevahetushaigust. USA-s testitakse vastsündinuid enam kui 40 haigusseisundi suhtes (25 primaarset ja 29 sekundaarset haigusseisundit), Euroopa Liidu liikmesriikide paneelid ja sõeltestimise kogemus erinevad üksteistest samuti olulisel määral (Lindner *et al.*, 2011; Dietzen *et al.*, 2009; Plass *et al.*, 2010; ACMG, 2006).

Kõige piiratumates programmides testitakse lisaks PKU-le ainult keskmise ahelaga atsüül-CoA dehüdrogenaasi puudulikkust (MCAD puudulikkus) ning metaboliite, mis ei ole informatiivsed nende haiguste diagnoosimiseks, ei analüüsita ega raporteerita. Saksamaal alustati 1999. aastal laia programmi, kuid 2005. aastal otsustati jätkata 12 ainevahetushaiguse testimist (Pollitt, 2006; Bodamer, 2007). Saksamaal on skriiningu juurutamises huvitav näide, kuna osa algselt paneelis olnud haigusi eemaldati, sest neid hinnati kahjutuks seisundiks või biokeemiliseks kõrvalekaldeks, millel puudub või on väga väike patoloogiline tähendus (Bodamer *et al.*, 2007).

Kaasasündinud ainevahetushaiguste esinemissagedus ja testimise tulemused erinevad riigiti olenevalt etnilisest taustast. Eri regioonide ja populatsioonide pilootprojektide tulemused on väga olulised ainevahetushaiguste infoallikad (Lindner *et al.*, 2007; Gan-Schreier *et al.*, 2010). Madalama esinemissagedusega haiguste puhul on sõeltestimise programmide efektiivsuse hindamisel oluline riigisisene laborite koostöö (mitme keskusega riikides) ning ka rahvusvaheline koostöö (Kölker *et al.*, 2006 ja 2007). Andmete võrdluseks on vajalikud suuremahulised rahvusvahelised andmebaasid ja erinevate regioonide programmide tulemused (Linder *et al.*, 2011).

1.5. Rahvusvaheline koostöö

USA *Mayo Clinic* 'u hallatav andmebaas ehk Region 4 Stork (R4S) on vastsündinute skriiningu MS/MS meetodil laboratoorse kvaliteedi parandamise koostööprojekt (McHugh *et al.*, 2011). Projekt algas 2004. aastal ning langes ajaliselt kokku ACMG ühtlustatud skriiningu paneeli tutvustamisega (Watson *et al.*, 2006). Algselt regionaalsest projektist on kasvanud välja laiahaardeline rahvusvaheline koostöövõrgustik, mida kasutavad aktiivselt 48 USA osariiki ning enam kui 80 vastsündinute sõeltestimise programmi rohkem kui 45 riigist (McHugh *et al.*, 2011).

Projekti peamiseks elemendiks on post-analüütilised vahendid, mille eesmärk on aidata interpreteerida võimalike haigusjuhtude analüütide profiili (Marquardt *et al.*, 2012). Interpretatsiooni tööriist arvutab skoori, mis iseloomustab konkreetse haigusjuhu tõenäosust, põhinedes haigusspetsiifiliste ning informatiivsete analüütide haigusseoselistel vahemikel. Rakendust on võimalik täpsemaks muuta korrigeerides analüüdi paneelide erinevusi ning proovide ettevalmistamise tehnikat (derivatiseeritud või derivatiseerimata proovid) (Hall *et al.*, 2014). R4S tulemused põhinevad tõestatult efektiivsetel diagnostilistel algoritmidel, on selgelt näidatud väga pika ahelaga atsüül-CoA dehüdrogenaasi puudulikkuse (VLCHAD) diagnoosimisel (Merritt *et al.*, 2014).

2014. aasta lõpu seisuga olid *Mayo Clinic*’u andmebaasis 33 757 504 vastsündinu tulemused, millest 17 825 on kinnitatud ainevahetushaiguste juhud (2014. aasta jooksul lisandus 1212 uut juhtu).

Eesti pilootprojekti esialgsete andmete põhjal kanti süsteemi 2014. aasta seisuga *cut-off* väärtused 6000 vastsündinu kohta.

1.6. Sõeltestimise efektiivsus ja eetika

Formaalset tõenduspõhist analüüsi VS kliinilise efektiivsuse kohta ei ole palju teostatud. PKU ja CH puhul on kliiniline efektiivsus üldtunnustatud, ehkki kliinilisi uuringuid ei ole kunagi läbi viidud (*U.S Congress, Office of Technology Assessment*, 1988). Üks põhjusi, miks kliinilisi uuringuid ei ole läbi viidud, seisneb selles, et need haigused on väga harvaesinevad; uuringusse tuleks kaasata väga suur arv vastsündinuid, et uuringul oleks sõeltestimise efektiivsuse hindamiseks piisav võimsus (Wilcken *et al.*, 2003). Teine põhjus seisneb selles, et mitme haiguse puhul on kliinilise kogemuse põhjal levinud kindel veendumus, et varasest diagnoosist on kindel kasu patsiendi ravitulemusele ning avalikud kampaaniad on üles kutsunud universaalsele sõeltestimisele (Marshall, 2002; Wilcken *et al.*, 2003).

Austraalia MS/MS skriiningu tulemustest, mis hõlmasid 362 000 vastsündinut, leiti, et kaasasündinud ainevahetushaiguste (v.a PKU) esinemissagedus on 15,7 juhtu 100 000 sünni kohta, mis erineb kuni kaks korda varasematest, sümptomitel põhinevate diagnooside andmetest 8,6-9,5 juhtu 100 000 vastsündinu kohta enne MS/MS programmi juurutamist (Wilcken *et al.*, 2003). Haiguslugudest lähtub, et kuuendaks eluaastaks kaasnes MS/MS meetodil diagnoositud patsientidel vähem surmajuhtumeid ja kliiniliselt tõsiseid häireid (Wilcken *et al.*, 2009). Piisava efektiivsuse saavutamine eeldab haiguse diagnoosimist ning ravi alustamist enne sümptomite avaldumist (Schulze *et al.*, 2003). MS/MS meetodil

vastsündinute testimine avastab tervikuna rohkem haigusjuhtusid kui kliiniliste sümptomite alusel diagnoosimine, kuid suurem avastusmäär on seotud kindlate haigustega (eelkõige MCAD) (Wilcken *et al.*, 2003).

Lisaks identifitseerib tundlik MS/MS kõrvalekalded, mis ei pruugi kliiniliselt avalduda ning võib põhjustada asjatut meditsiinilist sekkumist. Juhtude diagnoosimine, mis ei pruugiks kunagi jõuda kliinilise tähelepanu alla, ei tohiks muutuda argumendiks laiendatud sõeltestimise programmi vastu üldiselt. Üksikute eranditega (lühikese ahelaga rasvhapete oksüdatsiooni puudulikkus, 3-metüülkrotonüül-CoA-karboksülaasi puudulikkus) põhjustab suur osa antud haiguste grupist siiski tõsist haigestumist ja suremust (Wilcken *et al.*, 2003). Kliiniliselt kahjutud kõrvalekalded tuleb skriiningu paneeli optimeerimisel testimiselt kõrvale jätta.

Majanduslikult on iga skriiningu programmi kulutatud euro säästnud enam kui 25 eurot raviteenuse ja sotsiaalkuludelt (Lindner *et al.*, 2007), mis kindlasti varieerub riigiti sõltudes tervishoiu kuludest. Siiski peegeldavad uuringute tulemused väiksemat koormust tervishoiusüsteemile ja paremat prognoosi patsiendile läbi kaalutletud ning professionaalse vastsündinute sõeltestimise programmi juurutamise (Wilcken *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011; Harms *et al.*, 2011; Prosser *et al.*, 2010).

Skriiningu programmi efektiivseks toimimiseks on sätestatud ka kindlad ajaraamid, mis erinevad riigiti ja laboriti. Eesmärk on kõikjal tagada kiire ja täpne analüüsi vastus, mis võimaldaks ravi alustada haiguse asümptomaatilises faasis. 99,5% proove peaksid jõudma laborisse esimese 16 päeva jooksul pärast sündi, analüüs peaks olema teostatud nelja (ideaalis kahe) tööpäeva jooksul ning 100% skriiningul avastatud positiivsetest juhtumitest peaks teavitatama enne, kui imik on 18 päeva vanune. Esmase ravi peaks algama enne imiku 21. elupäeva (Rousseau *et al.*, 2012).

MS/MS tehnoloogia võimaldab ühe analüüsi käigus väikesest vereplekist skriinida enam kui 30 ainevahetushaigust. Aastas skriinitakse maailmas enam kui kolm miljonit vastsündinut ning identifitseeritakse enam kui 500 kinnitatud haigusjuhtu. MS/MS on ennast seega tõestanud kui kliiniliselt oluline sõeltestimise meetodika (Chace *et al.*, 2002; Carpenter ja Wiley 2001 ja 2002; Zytkevicz *et al.*, 2001).

1.7. Sõeltestimine Eestis

Enne 1993. aastat puudus üle-Eestiline vastsündinute sõeltestimise programm. Vastsündinuid testiti ainult kolmes maakonnas (Tartumaa, Põlvamaa ja Jõgevamaa) CH suhtes alates 1989. aastast (Mikelsaar, 1998).

Alates 1993. aastast on kõiki Eesti vastsündinuid uuritud ühe päriliku ainevahetushaiguse – PKU – suhtes fluoromeetrilisel fenüülalaniini määramisel (Õunap *et al.*, 1998) ja 1996. aastast ühe endokriinhaiguse – CH – suhtes (Mikelsaar *et al.*, 1998). Nende andmete alusel on PKU esinemissagedus Eestis 1:6010 vastsündinu kohta (Õunap *et al.* 1998). Eestis on koostatud ka PKU ravijuhend, kus on ka määratletud, et esmane ravi peaks algama enne 21. elupäeva (Uudelepp *et al.*, 2012). Viimase kümne aasta jooksul on Eestis sõeltestimisega olnud püsivalt hõlmatud üle 99% vastsündinutest (Eesti Haigekassa, 2012).

Alates 01.01.2014 alustati SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabori geneetikakeskuses üle-Eestilise vastsündinute laiendatud sõeltestimise pilootprojekti, mille käigus lisati skriiningu paneeli lisaks PKU-le ja CH-le veel 17 ainevahetushaigust (aminohapete, orgaanilise hapete ja rasvhapete oksüdatsiooni häired) ja omandatud vitamiin B12 puudulikkus. Laiendatud sõeltestimisel diagnoositavad haigused, nende esinemissagedus ja määratavad metaboliidid on toodud töö lisas 1. Skriinitavate haiguste paneeli lisatud haiguste valik põhineb teiste riikide programmide kogemusel (Lindner *et al.*, 2011; ACMG, 2006; Loeber *et al.*, 2011). Alates 01.01.2015 on üle-Eestiline vastsündinute laiendatud sõeltestimine Eesti Haigekassa tervishoiuteenuste loetelus³.

³ <https://www.haigekassa.ee/et/partnerile/raviasutusele/tervishoiuteenuste-loetelu>

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Magistritöö eksperimentaalse osa eesmärkideks on vastsündinute laiendatud skriiningu projekti raames:

1. välise kvaliteedi kontrollskeemi (ERNDIM, www.erndim.org) atsüülkarnitiinide kontrollproovide hindamine SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabori geneetikakeskuses;
2. esimese 15 kuu tulemuste põhjal MS/MS tehnoloogial vereplekist määratavate metaboliitide otsusepiiride ehk protsentiilide väljaselgitamine;
3. pilootprojekti tulemuste hindamine.

2.2. Materjal ja metoodika

2.2.1. Proovid

Pilootuuringu käigus kogututi kuivatatud vereplekid Eesti vastsündinutelt vahemikus 01.01.2014 kuni 31.12.2014. Täiendavalt kasutati protsentiilide väljaselgitamiseks rutiinse sõeltestimise käigus vastsündinutelt kogutud proove vahemikus 01.01.2015 – 31.03.2015.

Vastsündinu kannast võetud vereproov on kogutud filterpaberile Whatman 903 (*GE Healthcare Life Sciences*, UK) vastsündinu 2. – 7. elupäeval (valdavalt 72-120 tunni jooksul pärast sündi), kuivatatud (4 h toatemperatuuril) meditsiinasutustes üle Eesti ning transporditud SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabori geneetikakeskusesse.

Pilootprojekti vältel skriinita 13 632 vastsündinut. Projektis osalemast keeldusid 49 vastsündinu vanemad (kõikidest sündidest 0,36%). 2015. aastal vahemikus 01.01.2015 – 31.03.2015 skriinita 3306 vastsündinut. Kokku sõeltestiti esimese 15 kuu jooksul 16 938 vastsündinut.

2.2.2. Tarvikud, kemikaalid ja aparatuur

- Tarvikud
 1. 96 auguline plaat (order no. 55010, *Chromsystems*)
 2. 50 ml mõõtkolb
 3. Automaatpipett: 8 realine (30-350 µl),
 4. Automaatpipett 1-10 ml

5. Pipetiotsikud (350 µl, 10 ml)
6. Kaitsekile 96 auguga plaadile (order no. 55011, *Chromsystems*)
7. Kile aukudega 96 auguga plaadile (order no. 55013, *Chromsystem*)
8. 8 realine verepleki hoidja (*Disk Holders plus, Labsystems Diagnostics Oy, Soome*)

- **Kemikaalid**

Sõeltestimise programmis kasutatakse *MassChrom Kit*⁴ aminohapete ja atsüülkarnitiinide analüüsiks LC-MS/MS meetodil (*Chromsystems, Gräfeling, Saksamaa*), mis sisaldab järgmisi reagente:

Kontrollproovid Level 1 (order no. 0192), Level 2 (order no. 0193), atsüülkarnitiinide ja aminohapete sisestandard I (order no. 55004), suksinüülatsetooni sisestandard II (order no. 55044), ekstraheerimispuhver (order no. 55008), derivatiseerimislahus (order no. 55005), üleslahustumispuhver (order no. 55006), loputuslahus (order no. 55007), mobiilne faas (order no. 55001).

- **Aparatuur**

1. UPLC/MS/MS (Waters, Milford, MA, USA)
2. Termoloksuti (Biosan PST -60HL-4, Läti)
3. Genevac EZ-2 kontsentraator (Genevac Ltd., UK)
4. Automaatne vereplekkide välja lööja (Woodpecker, diameeter 3 mm)

2.2.3. Proovide ettevalmistamine

- *Töölahuste valmistamine (sisestandard I):*

Sisestandardi I pudel võetakse sügavkülmast sooja toatemperatuurile ca 15 minutiks. Seejärel pudeli sisu lahustatakse 5 ml ekstraheerimispuhvril. Lahusega pudelil lastakse seista 5 minutit, loksutatakse ning seejärel kantakse lahus üle 50 ml mõõtkolbi. Pudelit pestakse kaks 2 korda 5 ml ekstraheerimispuhvriga, mis kantakse samuti 50 ml mõõtkolbi ning täidetakse kolb kuni 50 ml märgistuseni ekstraheerimispuhvriga.

- *Proovide ettevalmistamine:*

Kuivatatud vereplekkidest lüüakse välja 3 mm diameetriga kettad 96-augulisele plaadile (kasutades automaatset verepleki välja löömise masinat „*Woodpecker*“), vere kogus igas

⁴ <http://chromsystems.com>

proovis umbes 3.1 µl (±10%). Igale plaadile lüüakse proovide ette sisemiste kontrollide vereplekid Level 1 ja Level 2.

Seejärel 96-augulise plaadi kõikidesse kannudesse lisatakse vereplekile 200 µl sisestandard I. 96-augulist plaati loksutatakse termoloksutil 20 minutit pööretel 600 rpm (Biosan PST-60HL-4). Pärast loksutamist võetakse uus plaat, mille peale tõstetakse vereplekid koos hoidjaga. Esimene plaat sisestandard I jäetakse seisma. Oodatakse kuni temperatuur termoloksutil on 60 °C. Seejärel uue plaadi kõikidesse kannudesse lisatakse 150 µl sisestandard II ning plaati loksutatakse 60°C juures 30 minutit. Lõpuks kantakse sisestandard II ekstrakt kokku sisestandard I ekstraktiga.

Plaat aurutatakse kuivaks Genevac EZ-2 vaakumkontsentraatoril 45°C juures, kasutades programmi $H_2O + NH_3$, mille puhul „*Time to finale stage*“ on 25 minutit ja „*Final stage time*“ on 35 minutit. Kuivale plaadile lisatakse kõikidesse kannudesse derivatiseerimislahust 60 µl, plaat kaetakse kaitsekilega ning loksutatakse 60° C juures 15 minutit. Kaitsekile eemaldatakse ning plaat aurutatakse kuivaks Genevac EZ-2 vaakumkontsentraatoril 45° C juures, kasutades programmi „*Medium BP*“, mille puhul „*Time to final stage*“ on 10 minutit ja „*Final stage time*“ on 10 minutit.

Kuivale plaadile lisatakse kõikidesse kannudesse 200 µl üleslahustamispuhvrit ning loksutatakse 1 minut pööretel 600 rpm. Saadud lahust analüüsitakse masinas.

2.2.4. UPLC-MS/MS süsteem

Töös kasutati UPLC-MS/MS Waters Xevo TQD koos ACQUITY Ultra Performance vedelik-kromatograafia süsteemiga (Waters, Milford, MA, USA). Antud süsteemi eeliseks on see, et proovide analüüsil ei kasutata kromatograafilist kolonni. See võimaldab analüüsi läbi viia väiksema ajakuluga. Selleks, et hoida ära masinal kapillaaride ummistamist, kasutatakse kolonni asemel PEEK filtrit.

Käesoleva *MassChrom kit*’i puhul kasutatakse järgmisi masina seadistusi:

| | |
|--------------|-----------------|
| Süsti suurus | 10 µl |
| Analüüsiaeg | 1.7 min |
| Gradient | 20 – 600 µl/min |

Meetodi täpsed parameetrid ja massiüleminekud on kättesaadavad: www.chromsystems.com.

Töös kasutatakse *In vitro* Diagnostic (IVD) kit'i.

- Gradiendi programm:

| | | | | | | | |
|---|-----|------|------|------|------|-----|------|
| Aeg | 0 | 0.24 | 0.25 | 1.24 | 1.25 | 1.5 | 1.51 |
| Eluendi voolukiirus (µl/min) | 200 | 200 | 20 | 20 | 600 | 20 | 20 |

- Skaneerimise režiimid:

| Skaneerimise režiim | Mõõdetavad metaboliidid |
|---|--|
| <i>Multiple reaction monitoring (MRM)</i> | Gly, Pro, Orn, SucA, Cit, Ar |
| <i>Precursor Ion Scan</i> | Kõik atsüülkarnitiinid (C0 – C18). |
| <i>Neutral Loss Scan (NL)</i> | Ala, Val, Leu, Met, Phe, Tyr, Asp, Glu |

Elektronpihustus ionisatsiooni allikat opereeriti positiivses iooni režiimis, kapillaarpinge 4.0 kV ja koonuspinge 30 V. Rakugaasina kasutati argooni. Koonusgaasi kiirus oli 100 L/h ja desolvatatsiooni gaasi kiirus 700 L/h. Ioonallika temperatuur 150° C ja desolvatatsiooni temperatuur 350° C, ekstraktsiooni pinge 3.0 V.

- MS/MS andmete analüüs

Andmete analüüs teostati Neolynx 4.0 programmiga (Micromass Limited, Manchester, UK), mis kohandati MS/MS tingimustele.

Kontsentratsioonide arvutused tehti sisestandardi suhtes põhimõttel:

- Ühendi A signaali intensiivsus proovi massispektris (= A_{sample})
- Sisestandardi signaali intensiivsus proovi massispektris (= I_{sample})
- Sisestandardi prooviga seotud kontsentratsioon C (= $C_{standard}$)

Canalüüt, proovis kontsentratsiooni arvutus:

$$\text{Canalüüt, proovis } (\mu\text{mol/l}) = \frac{A_{sample}}{I_{sample}} * C_{standard}$$

2.2.5. Verifitseerimine ja kvaliteedikontroll

Igale 96-augulisele plaadile kantakse analüüsiks sisemise kontrolli proovid Level 1 ja Level 2, et hinnata analüüsi täpsust. Verifitseerimise käigus määrati eespool kirjeldatud meetodile järgmised karakteristikud: saagis ja mõõtemääramatus. Saadud tulemusi võrreldi *Chromsystems*'i tulemustega. Valideeriti metaboliidid, mis ei ole *Chromsystems*'i metoodikas valideeritud: C3DC; C4OH; C4DC; C5:1; C5OH; C8:1; C10:1; C14:1; C14:2 C14:OH; C16:1; C16:OH; C16:1OH; C18:1; C18:1OH; C18:2OH; C18OH.

Analüüsi kvaliteedi tagamiseks hinnati sisestandardi intensiivsust. Analüüsiti sisemise kontrolli proovide (Level 1 ja Level 2) tulemuste jäävust lubatud vahemikku ning tulemused kanti X-kaardil (± 2 stdv). Kontrollmetaboliitidena kasutati C8; Gly ja Phe (iga analüüti analüüsitakse erinevas MS/MS skaneerimise režiimis). Analüüsi korratakse, kui eelnevad tingimused ei ole täidetud.

2.2.6. Võrdluskatsete läbiviimine ja interpretatsioon

Võrdluskatsed viidi läbi ERNDIM (*European Research Network for Evaluation and Improvement of Screening, Diagnosis and Treatment of Inherited Disorders of Metabolism*) Qualitive Blood Spot Acylcarnitine Scheme raames (*Quality Assurance in Laboratory Testing for IEM*), mis väliste kontrollproovide kasutamisega hindab objektiivselt labori võimekust ja täpsust identifitseerida kaasasündinud ainevahetushaigusi atsüülkarnitiinide profiili analüüsimisel vereplekkidest.

Proovid valmistati ette ja analüüsiti metoodikas välja toodud kirjelduse alusel.

Vereplekkide iseloomustus:

22b – 55 aastane naine, mõõdukas lihasnõrkus ja episoodiline valu.

22c – 43 aastane naine, lapsepõlves ketoatsidoos ja heptatomegaalia, hetkel terve.

23a – 20 aastane naine, lapsepõlves kogetud hüpoglükeemilise entsefalopaatia episood, hetkel terve.

23b – 20 aastane mees, anamneesis hüperammoneemia koos maksa düsfunktsiooniga, hetkel terve.

23c – 25 aastane naine, lapsepõlves kogetud hüpoglükeemia ja kardiomiopaatia episood, hetkel terve.

Proovide MS/MS tulemusi analüüsiti vastavalt üksikute metaboliitide ning erinevate metaboliitide suhete kontsentratsioonidele. Esialgse tulemuse kinnitamiseks sisestati andmed *Mayo Clinic*'u andmebaasi, mis võrdles katsetulemusi kõikide sisestatud andmetega ning arvutas metaboliitide väärtuse alusel patsienti iseloomustava skoori, mis kinnitas või lükkas ümber kahtluse kaasasündinud ainevahetushaiguse esinemiseks kontrollproovis. R4S rakendus on välja töötatud arvulistel tulemustel põhinevate laboriandmete analüüsimiseks.

Kontrollproovide 22b ja 22c interpretatsiooni võrreldi ametliku tagasiside raporti tulemustega 2014. aastal. Kontrollproovide 23a; 23b; 23c ametlik tagasiside laborile ei ole veel avalikustatud.

2.2.7. Protsentiilide arvutamine

Vastsündinute kaasasündinud ainevahetushaiguste skriiningprogrammi 15 esimese kuu andmete põhjal arvutati metaboliitide 1-protsentiil ja 99-protsentiil, et määrata haigusseisunditele iseloomulikud kõrvalekalded võrreldes tervete vastsündinute vastavate metaboliitide tasemega. Andmetöötluseks kasutati programme Excel (Microsoft Corp., Redmond, OR, USA) ja SAS 9.2. (SAS Institute Inc., NC, USA).

Arvutuste tegemisel võeti valimist välja kordusanalüüsile suunatud proovid (korratud tulemus jäeti sisse) ning haigusliku kõrvalekaldega proovid. Esimese 6 kuu protsentiilid arvutas välja SA Tartu Ülikooli Kliinikumi statistik Pille Kool.

2.2.8. Eetika

Vastsündinute laiendatud sõeluurimise pilootprojekti läbiviimiseks andis loa Tartu Ülikooli eetikakomitee (taotlus nr 231/T-5; koosolek 18.11.2013).

2.3. Tulemused

2.3.1. Metoodika verifitseerimine

Laborisisese metoodika kvaliteedi kontrolliks hinnati sisemise kontrolli proovide Level 1 ja Level 2 tulemuste põhjal metaboliitide saagise ning mõõtemääramatuse vahemikud ning võrreldi neid *Chromsystems*'i poolt kinnitatud tulemustega (arvutuste tulemused on toodud töö lisas 2). Aminohapete puhul oli saagis 74-111% ning atsüülkarnitiinide puhul 70-109%. Mõõtemääramatus aminohapete analüüsil oli 5,22-13% ning *Chromsystems*'i poolt valideeritud atsüülkarnitiinide puhul 5,2-19,6%. Mõõtemääramatuse erinevus metoodikas lubatud väärtuse ning kontrollproovide tulemustes oli aminohapete puhul kuni 7,07% (kontrollproovide kahjuks) ning atsüülkarnitiinide puhul osutus kõikide analüüsitud metaboliitide puhul mõõtemääramatuse väärtus madalamaks meetodis lubatud väärtusest. Meetodis valideerimata atsüülkarnitiinide saagis arvutati lähtuvalt sisemise kontrolli proovide metaboliitide keskmisest kontsentratsioonist, mis võrdsustati 100%-ga; mõõtemääramatuse vahemik 22,6-65,59% (C18:1OH puhul 103,73% ja 70,66%, Level 1 ja 2, vastavalt).

20 juhuslikult valitud analüüsi Level 1 ja Level 2 kontrollmetaboliitide C8; Gly ja Phe X-kaardid, mis iseloomustavad vastava metaboliidi väärtuse kõikumist keskmise väärtuse ning lubatud ± 2 standardhälbe vahemikus on toodud töö lisas 3.

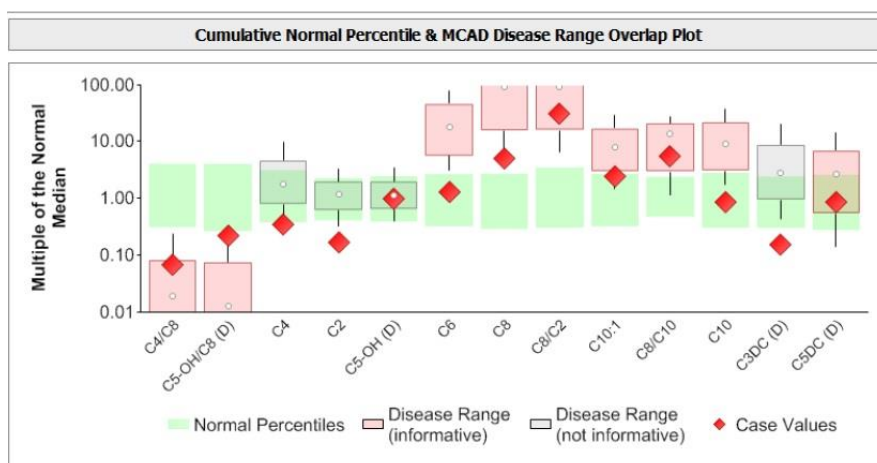
2.3.2. Võrdluskatsete interpretatsioon

Välised võrdluskatsed teostati ERNDIM kvaliteediprogrammi raames. Välised proovid analüüsiti vastavalt sõeltestimise protokollile ning tulemusi interpreteeriti lähtuvalt laborisisestest *cut-off* väärtustest. Esmalt teostati üksikute metaboliitide ning metaboliitide suhete kontsentratsioonidel põhinev analüüs, mis arvestab metaboliitide tasemete muutusi, mis on välja toodud töö lisas 1. Analüüsi tulemus loob kahtluse kindla sõeltestitava ainevahetushaiguse esinemiseks, misjärel analüüsi tulemused sisestatakse *Mayo Clinic*'u projekti R4S andmebaasi. Sisestusi võrreldakse kõikide andmebaasi sisestatud tulemustega ning rakendus annab igale konkreetsele juhule skoori, mis iseloomustab kahtlustatava ainevahetushaiguse esinemise tõenäosust. Interpretatsiooni tulemusi on võrreldud võrdluskatsete tulemuste raportiga. 2014. aasta kontrollkatsete tulemusi ei ole veel avalikustatud.

- Analüüsi ID: 22b

Atsüülkarnitiinide profiili iseloomustab kõrgenenud C8 väärtus 0,34 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 0-0,18 $\mu\text{mol/L}$). Diagnostiliselt olulised metaboliitide suhted on samuti kõrgenenud: C8/C10= 4.25 (norm <2.5), C8/C0 = 0.021 (norm <0.01) ja C8/C2=0.09. Esmane metaboliitide analüüs viitab võimalikule MCAD puudulikkuse esinemisele patsiendil.

R4S andmebaasi MCAD kahtlusega kontrolliproovi metaboliitide kontsentratsioonide sisestamisel saadi haigussskoor väärtusega 30 (skoor >20 ja <70), mis iseloomustab võimalikku MCAD puudulikkuse esinemist ning kinnitab esialgset interpretatsiooni. Kontrolliproovi 22b metaboliitide ja suhtarvude võrdlus normivahemike ning haigusseoseliste kõrvalekalletega on toodud joonisel 6.



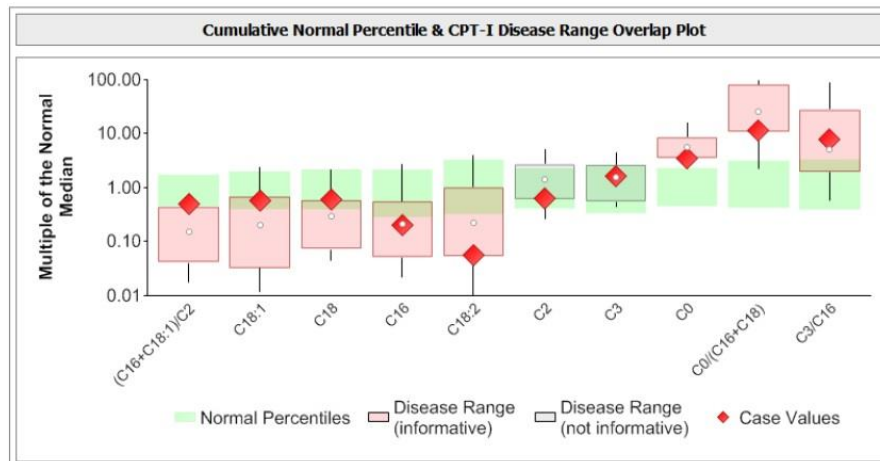
Joonis 6. Referentsvahemikus protsentiilide ja MCAD puudulikkuse haigusseoseliste kontsentratsioonide vahemiku kattuvuse graafik. Analüüsi tulemusi iseloomustab C8 väärtuse tõus, mis ületab normaalset protsentiilide vahemikku, kuid jääb madalamaks kui konkreetselt haigusseoselised väärtused. Haigusseoseliste kõrvalekalletele viitavad C8/C2 ja C8/C10 kontsentratsioonide suhtarvud.

ERNDIM tagasiside raportis välja toodud tulemused osalevate laborite lõikes: C8 mediaan 0,5 $\mu\text{mol/L}$ (vahemik 0,32–1,20 $\mu\text{mol/L}$); C8/C10= 4,1 (vahemik 3,0–6,7); C8/C2= 0,07 (vahemik 0,04-3,0); vaba karnitiin C0 mediaan 15,5 $\mu\text{mol/L}$ (vahemik 11,3-22,0 $\mu\text{mol/L}$).

- Analüüsi ID: 22c

Analüüsi atsüülkarnitiinide profiili iseloomustab kõrgenenud C0 väärtus, 78,7 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 7,18-51,2 $\mu\text{mol/L}$) ning langenud C16 väärtus, 0,56 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 0,80-5,78 $\mu\text{mol/L}$). Esmase hinnanguna võib tegemist olla karnitiin-palmitoüültransferaasi I puudulikkusega (CPT I), kuid olulised C18 ja C18:1 kontsentratsioonid on normi piirides, vastavalt 0,47 $\mu\text{mol/L}$ ja 0,72 $\mu\text{mol/L}$ (CPT I puhul peaks antud metaboliitide väärtus langema). Diagnostiliselt olulise suhtarvu C0/(C16+C18) väärtus on

märgatavalt tõusnud, olles 76,4 $\mu\text{mol/L}$ (norm <30), seega hinnatakse analüüsi kahtluseks CPT I võimalik esinemine. R4S rakendusse sisestatud väärtuste alusel konstrueeritud graafik on toodud joonisel 7.



Joonis 7. Referentsvahemikus protsentiilide ja CPT I haigusvahemiku kattuvuse graafik. C18:2 ning C16 väärtus viitavad haiguslikule kõrvalekaldele, samuti C0/(C16+C18) ja C3/C16 suhtarvud. Ülejäänud CPT I diagnoosimise jaoks olulised metaboliidid jäävad normivahemikesse.

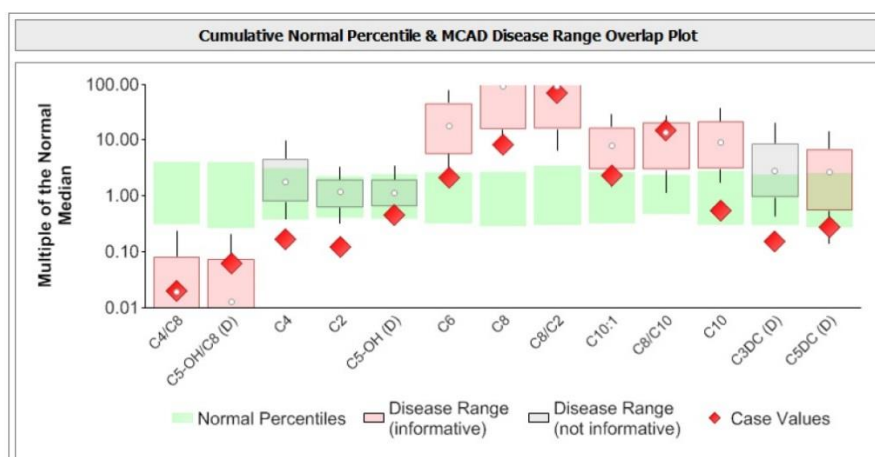
R4S rakendus arvutas analüüsi üldskooriks 43, mis tähendab, et võimalik on CPT I esinemine. Kinnitatud haigusjuhtudega võrreldes kuulub analüüsi tulemus 5-protsentiili hulka.

Võrdluskatsete tagasiside raportis toodi välja kõrgenenud tasemega vaba karnitiini, mediaan 85,7 $\mu\text{mol/L}$ (vahemik 42,0-155,0 $\mu\text{mol/L}$), ning kogenenud suhtarvu C0/(C16+C18), mediaan 56,9 $\mu\text{mol/L}$ (vahemik 4,6-70,9 $\mu\text{mol/L}$). Lisaks raporteeriti C3 kontsentratsiooni tõusu, mediaan 5,0 $\mu\text{mol/L}$ (vahemik 3,6-7,1 $\mu\text{mol/L}$). Kõige tõenäolisem diagnoos kontrollproovile oleks raporti tagasiside alusel olnud metüülmalonaatatsiduuria (MMA) või propionaatatsiduuria (PPA), mida iseloomustab kõrgenenud C3 väärtus. Kontrollkatses oli C3 väärtus 2,73 $\mu\text{mol/L}$ (referents 0-4,69 $\mu\text{mol/L}$) ning seega metaboliidi kontsentratsiooni tõusu analüüsis ei tuvastatud.

2013. aastal geneetikakeskuses teostatud sama kontrollproovi analüüsi tulemustes iseloomustas atsüülkarnitiinide profiili samuti C0 väärtuse tõus, 75,1 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 22,4-57,9 $\mu\text{mol/L}$) ning C16 väärtuse langus, 0,64 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 2,28-5,24 $\mu\text{mol/L}$). C3 kontsentratsioon oli 4.89 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 2.81-6.91 $\mu\text{mol/L}$), seega metaboliidi tõusu ei raporteeritud.

- **Analüüsi ID: 23a**

Atsüülkarnitiinide profiili iseloomustab kõrge C8 väärtus 0,57 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 0-0,18 $\mu\text{mol/L}$), lisaks kõrge C8/C10=11,4 (norm <2.5) ja C8/C0=0,088 (norm <0.01). Vaba karnitiini väärtus on langenud, C0=6,51 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 7,18-51,2 $\mu\text{mol/L}$), samuti on langenud C2 väärtus, C2=2,63 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 8,15-49,0 $\mu\text{mol/L}$). Esmase tulemus viitab MCAD puudulikkuse kahtlusele.

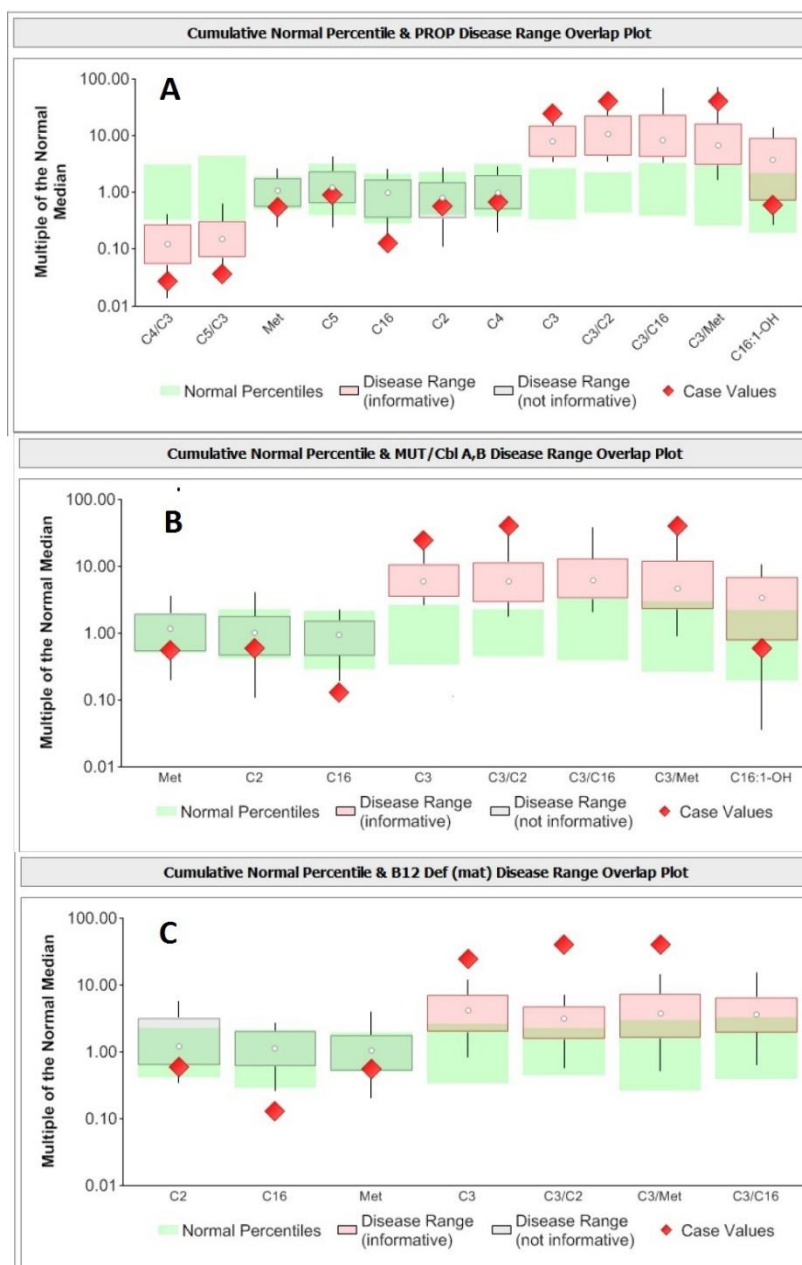


Joonis 8. Referentsvahemikus protsentiilide ja MCAD puudulikkuse haigusseoseliste kontsentratsioonide vahemike graafik. Analüüsi tulemusi iseloomustavad selged võtmemetaboliidi C8 ja oluliste suhtarvude C8/C10 ning C8/C2 tõusud, mis paiknevad haigusseoselistes vahemikes või on neile lähedaste väärtustega. Lisaks esmasel interpretatsioonil uuritavate metaboliitidele, on analüüsitulemustes haiguse hindamisel informatiivsed ka C4/C8 ja C5OH/C8 suhtarvud.

R4S andmebaasi analüüsi tulemused on toodud joonisel 8. Haigusseisundi skoor on 119, mis tähendab, et tegemist on usutavalt MCAD puudulikkusega (vahemik >70 ja <180). Kõikidest andmebaasi sisestatud ja kinnitatud juhtude skooridest paikneb antud analüüs 17-protsentiili seas.

- **Analüüsi ID: 23b**

Atsüülkarnitiinide profiili iseloomustab märkimisväärselt kõrge C3 väärtus 40,7 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 0-4,69 $\mu\text{mol/L}$). Lisaks on kõrge suhtarvud C3/C2= 3,28 (norm <0,2 *Mayo Clinic*'u andmetel) ja C3/C16=116,28 (norm <2,0 *Mayo Clinic*'u andmetel). Kõrvalekalded viitavad nii MMA, PPA kui vitamiin B12 puudulikkuse võimalikule esinemisele. Seega sisestati tulemused R4S andmebaasi haigussskooride arvutamiseks kõikide kahtlustavate haiguste suhtes, tulemused on toodud joonisel 9.

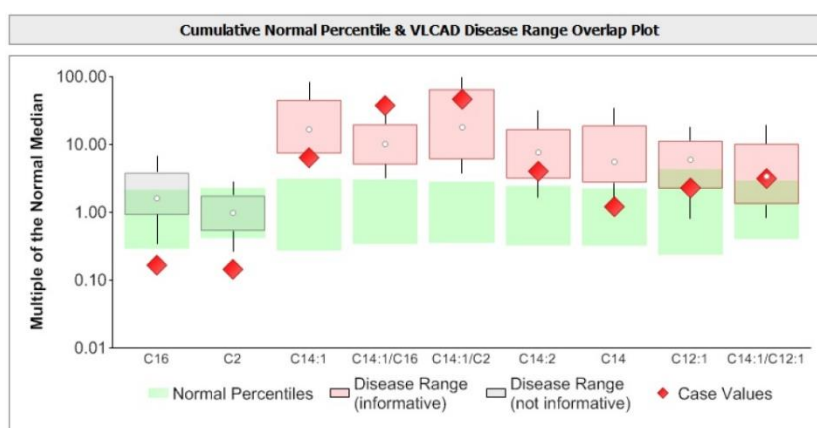


Joonis 9. A) illustreerib MMA referentsvahemikke ja haiguspetsiifilisi metaboliitide kontsentratsioone; B) PPA referentsvahemikke ja haiguspetsiifilisi metaboliitide kontsentratsioone; C) vitamiin B12 puudulikkuse referentsvahemikke ja haiguspetsiifilisi metaboliitide kontsentratsioone. Kõikide kahtlustavate haigusseisundite puhul on märgata C3 taseme ning C3/C2 ja C3/Met suhtarvude kõrgenemist, mis on iseloomulik patoloogilisele seisundile, ehkki C2 ja Met väärtus eraldiseisvana on normvahemikus.

Konkreetses ainevahetushaiguse kindlaks tegemiseks kasutati haiguspetsiifilistest metaboliitidest tuletatud summaarset skoori, mis MMA puhul oli väärtusega 0, vitamiin B12 puudulikkuse puhul väärtusega 0 ja PPA puhul väärtusega 472 (>165 väärtus kirjeldab väga suure tõenäosusega PPA diagnoosi), antud tulemus on andmebaasi siestatud kinnitatud PPA tulemuste seas 99-protsentiili seas. Seega lähtuvalt kontrollproovi metaboliitide kontsentratsioonidest raporteeriti kontrollproovi tulemuseks PPA esinemine.

- Analüüsi ID: 23c

Atsüülkarnitiinide profiili iseloomustavad metaboliitide C14:1 ja C14:2 tõusud, vastavalt 0,69 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 0-0,33 $\mu\text{mol/L}$) ja 0,12 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 0-0,07 $\mu\text{mol/L}$). Langenud on C0 ja C2 kontsentratsioonid, vastavalt 6,41 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 7,18-51,2 $\mu\text{mol/L}$) ja 3,05 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 8,15-49,0 $\mu\text{mol/L}$). Märkimisväärselt on seega kõrgeenenud suhted $\text{C14:1/C0}=0,11$ ja $\text{C14:1/C2}=0,23$. Esmane metaboliitide analüüs viitab VLCAD puudulikkuse kahtlusele.



Joonis 10. Referentsvahemiku ja VLCAD puudulikkuse haiguspetsiifiliste protsentiilide vahemike graafik koos analüüsi tulemustega. Analüüsitud proovi iseloomustavad selged haigusele iseloomulikud C14:1; C14:2 ja suhtarvu C14:1/C2 väärtused. C12:1 väärtust antud skriiningu programmis ei määrata, vastava metaboliidi väärtust hinnatakse võtmemetaboliit C14:1 väärtuse alusel.

Kontrollproovi tulemus R4S rakenduses on toodud joonisel 10. Kuna C12 väärtust VS paneelis ei määrata, siis kasutatakse antud metaboliidi kontsentratsiooni hindamiseks C14:1 väärtust. Üldskooriks arvutati 187 (tulemus >110), mis viitab, et tegemist on suure tõenäosusega VLCAD-iga. Tulemuse alusel paikneb kontrollproov andmebaasis kinnitatud VLCAD puudulikkuse tulemuste seas 44-protsentiili seas.

2.3.3. Metaboliitide otsusepiiride määramine

Vastsündinute laiendatud sõeltestimise programmi 15 kuu jooksul testitud vastsündinute proovide põhjal arvutatud metaboliitide otsusepiirid 1. ja 99. protsentiili alusel on kokkuvõtvalt toodud tabelis 3.

Tabel 3. Analüüsitavate metaboliitide protsentiilid.

| Metaboliit | 6 kuu protsentiilid | | | 15 kuu protsentiilid | | |
|------------|--|----------------------------------|---|--|----------------------------------|---|
| | 1-protsentiil ($\mu\text{mol/L}$) | Mediaan ($\mu\text{mol/L}$) | 99-protsentiil ($\mu\text{mol/L}$) | 1-protsentiil ($\mu\text{mol/L}$) | Mediaan ($\mu\text{mol/L}$) | 99-protsentiil ($\mu\text{mol/L}$) |
| Ala | 110.37 | 211.94 | 503.18 | 107.33 | 203.64 | 484.12 |
| Arg | 5.83 | 16.32 | 48.91 | 5.28 | 14.60 | 47.76 |
| Asp | 26.76 | 64.30 | 280.93 | 26.50 | 63.85 | 275.08 |
| C0 | 7.18 | 17.65 | 40.2 | 8.01 | 19.22 | 50.49 |
| C10:1 | 0.01 | 0.02 | 0.06 | 0.01 | 0.02 | 0.06 |
| C10 | 0.01 | 0.05 | 0.14 | 0.01 | 0.05 | 0.13 |
| C12 | 0.04 | 0.17 | 0.56 | 0.04 | 0.16 | 0.50 |
| C14:1 | 0.03 | 0.10 | 0.28 | 0.03 | 0.10 | 0.27 |
| C14:2 | 0.00 | 0.01 | 0.03 | 0.00 | 0.01 | 0.03 |
| C14 | 0.06 | 0.17 | 0.37 | 0.06 | 0.17 | 0.37 |
| C14OH | 0.00 | 0.01 | 0.04 | 0.00 | 0.01 | 0.05 |
| C16:1 | 0.03 | 0.16 | 0.35 | 0.03 | 0.17 | 0.39 |
| C16:1OH | 0.01 | 0.04 | 0.1 | 0.01 | 0.05 | 0.13 |
| C16 | 0.87 | 2.82 | 5.73 | 0.87 | 2.89 | 5.93 |
| C16OH | 0.00 | 0.02 | 0.05 | 0.00 | 0.02 | 0.08 |
| C18:1 | 0.09 | 1.29 | 2.63 | 0.47 | 1.29 | 2.59 |
| C18:1OH | 0.01 | 0.03 | 0.09 | 0.01 | 0.05 | 0.17 |
| C18:2OH | 0.02 | 0.04 | 0.09 | 0.01 | 0.05 | 0.15 |
| C18 | 0.29 | 0.81 | 1.81 | 0.28 | 0.79 | 1.78 |
| C18OH | 0.00 | 0.00 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.03 |
| C2 | 8.15 | 22.20 | 49.02 | 6.46 | 20.65 | 48.00 |
| C3 | 0.34 | 1.59 | 4.63 | 0.25 | 1.47 | 4.31 |
| C3DC | 0.01 | 0.04 | 0.11 | 0.01 | 0.05 | 0.13 |
| C4 | 0.04 | 0.16 | 0.52 | 0.05 | 0.16 | 0.55 |
| C4DC | 0.1 | 0.29 | 0.73 | 0.10 | 0.31 | 0.82 |
| C4OH | 0.04 | 0.15 | 0.39 | 0.03 | 0.15 | 0.40 |
| C5:1 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.01 | 0.02 |
| C5 | 0.05 | 0.12 | 0.32 | 0.05 | 0.12 | 0.34 |
| C5DC | 0.02 | 0.08 | 0.21 | 0.02 | 0.08 | 0.21 |
| C5OH | 0.03 | 0.09 | 0.19 | 0.03 | 0.09 | 0.20 |
| C6 | 0.02 | 0.05 | 0.1 | 0.01 | 0.04 | 0.10 |
| C8:1 | 0.01 | 0.06 | 0.17 | 0.01 | 0.00 | 0.17 |
| C8 | 0.01 | 0.03 | 0.08 | 0.01 | 0.03 | 0.08 |
| Cit | 5.74 | 11.37 | 35.08 | 5.85 | 11.65 | 36.14 |
| Glu | 272.23 | 468.27 | 811.33 | 274.26 | 476.67 | 834.67 |
| Gly | 211.14 | 375.06 | 923.58 | 200.16 | 370.46 | 926.88 |
| Leu | 69.53 | 126.54 | 217.64 | 67.60 | 123.46 | 213.58 |
| Met | 4.22 | 9.89 | 18.53 | 3.82 | 10.03 | 20.78 |
| Orn | 42.48 | 102.46 | 404.23 | 41.04 | 101.55 | 404.19 |
| Phe | 28.57 | 49.06 | 81.04 | 28.48 | 49.07 | 82.08 |
| Pro | 87.39 | 159.83 | 297.96 | 83.52 | 156.70 | 300.05 |
| SucA | 0.21 | 0.36 | 0.75 | 0.18 | 0.41 | 0.75 |
| Tyr | 42.5 | 94.75 | 251.78 | 0.44 | 90.60 | 245.30 |
| Val | 46.88 | 89.70 | 163.86 | 43.96 | 85.09 | 157.98 |

2.3.4. Pilootprojekti koondtulemused

Vastsündinute laiendatud sõeltestimise pilootprojekti käigus testiti vahemikus 01.01.2014 – 31.12.2014 kokku 13 632 vastsündinut. Analüüsist leitud kõrvalekalde tõttu kutsuti välja 33 vastsündinut. Projektis osalemast keeldusid 49 vastsündinu vanemad (kõikidest sündidest 0.36%) ning seega kaeti laiendatud sõeltestimisega pilootuuringu jooksul 99.64% Eesti vastsündinutest.

01.01.14 – 30.06.14 kutsuti välja 22 last (kokku sõeltestitud 6339), 01.07.14. – 31.12.14 kutsuti välja 11 last (kokku sõeltestitud 7293). Pilootprojekti raames esines 25 valepositiivset tulemust, mis tähendab osakaalu 0.18% esimese 12 kuu lõikes, kusjuures projekti esimese 6 kuu tulemustes oli FPR 0.28% ning teise 6 kuu tulemustes langes see 0.09%-ni. PPV oli esimese 6 kuu lõikes 18%; teisel poolaastal 36% ning esimese aasta lõikes tervikuna 24%.

2015. aasta esimese kolme kuuga (01.01.15-31.03.15) skriiniti 3306 vastsündinut, täiendavale kontrollile kutsuti 3 last, neist kinnitati diagnoos 1 vastsündinul. FPR oli kolme kuu lõikes 0.06% ja PPV 33%.

Esimese 15 kuu jooksul skriiniti kokku 16 938 last, kinnitatud diagnoosi sai 9 last (1:1882 vastsündinu kohta). Programmi FPR tervikuna oli 0.16%, PPV 25%, teadaolevalt valenegatiivseid tulemusi hetkeseisuga ei ole. Projekti koondtulemused on toodud tabelis 4.

Tabel 4. Skriiningu koondtulemused.

| | 01.01.- 30.06.14 | 01.07.- 31.12.14 | Pilootprojekt 2014 | 01.01.- 31.03.15 | 15 kuud koondtulemused |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| Sõeltestitud kokku | 6339 | 7293 | 13632 | 3306 | 16938 |
| Tagasi kutsutud | 22 | 11 | 33 | 3 | 36 |
| Valepositiivsed | 18 | 7 | 25 | 2 | 27 |
| Tõelised positiivsed | 4 | 4 | 8 | 1 | 9 |
| Tõelised negatiivsed | 6335 | 7289 | 13624 | 3305 | 16929 |
| Valepositiivsete osakaal (FPR) | 0.28% | 0.10% | 0.18% | 0.06% | 0.16% |
| Positiivne ennustav vääratus (PPV) | 18% | 36% | 24% | 33% | 25% |

2.4. Arutelu

Vastsündinute laiendatud sõeltestimisel MS/MS meetodil saab identifitseerida enam kui 30 ainevahetushaigust üheainsa analüüsi käigus ning tuvastada patsiente enne sümptomite avaldumist või haiguse varases faasis. See võimaldab parandada haiguse kaugprognoosi ning tagada patsiendile eakohane areng. Tänu metoodika tundlikkusele, suurele läbilaskevõimele ning efektiivsusele on laiendatud VS programmid juba rakendatud paljudes Euroopa Liidu riikides, USA-s, Austraalias ning mujal. Testitavate haiguste paneel erineb riigiti, arvestades haiguse esinemissagedust, aga ka tervishoiuökonoomika parameetreid ning prognoose.

2014. aastal alustati SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabori geneetikakeskuses Eesti vastsündinute laiendatud skriiningu pilootprojektiga, mille jooksul skriinita 13 632 vastsündinut. Lisaks hinnati laborisise parameetrite ning väliste kontrollproovide abil meetodi töökindlust, määrati Eesti populatsioonile iseloomulikud metaboliitide referentsvahemikud, kasutades 1. ja 99. protsentiili ning haiguslikule kõrvalekaldele viitavad otsusepiirid (*cut-off* väärtused). 2015. aastal alustati Eestis riiklikku vastsündinute laiendatud skriiningprogrammi. 15 esimese kuu jooksul skriinita 16 938 vastsündinut, kellest on kinnitatud kaasasündinud ainevahetushaiguse diagnoosi saanud 9 patsienti (1:1882 vastsündinu kohta).

Kliinilises kasutuses laboratoorsete analüüside kvaliteedi kontroll jaguneb kaheks. Esiteks sisemine kvaliteedi kontroll, millega labor iseseisvalt rakendab tööprotsessis meetodeid, et hinnata juurutatud analüüsi töökindlust ning täpsust. Teiseks, väliste kvaliteedi kontrolli meetodite rakendamine ja koostööprogrammides osalemine, mille eesmärk on objektiivne analüüside tulemuste võrdlus teiste laboritega.

Laborisisesel kvaliteedi tagamisel jälgiti kontrollproovide Level 1 ja Level 2 metaboliitide kontsentratsioone ning võrreldi neid meetodis lubatud saagise ja mõõtemääramatuse vahemike väärtustega. Meetodis lubatud saagise vahemik oli aminohapete puhul 51-94% ja atsüülkarnitiinide puhul 62-89%. Analüüsitud kontrollproovide puhul oli tegelik saagis laboris aminohapete puhul 74-111% ja meetodis valideeritud atsüülkarnitiinide puhul 70-109%. Seega on labori tulemused keskmiselt suurema saagisega kui meetodi tingimustes. Mõõtemääramatuse puhul hindasime piisavalt täpseks analüüsi tulemusi, mille korral erinevus kontrollproovide ja meetodis lubatud väärtuste vahel oli kuni 10% metoodikas kinnitatud väärtuse kasuks. Need tulemused õnnestus ka saavutada. Suurema osa metaboliitide puhul

õnnestus meil tagada väiksem mõõtemääramatuse väärtus, kui *Chromsystems*'i metoodikas välja toodud, välja arvatud aminohapete SucA; Arg; Ala; Met ja Orn puhul, kus meie labori keskmine standardhälve osutus suuremaks. Atsüülkarnitiinide puhul jäi laboripoolne mõõtemääramatus protsentuaalselt väiksemaks kui *Chromsystems*'i metoodikas kõikide metaboliitide puhul. Mõõtemääramatus oli kõrgem meetodis valideerimata atsüülkarnitiinide puhul, tulemust selgitab antud metaboliitide väike kontsentratsioon, mis tähendab juba väikese kõrvalekalde puhul protsentuaalselt suurt standardhälvet. Kontrollproovide metaboliitide C8; Gly; Phe väärtuste kandmine X-kaardile viitab, et sisemise kontrolli proovide väärtus jääb lubatud vahemikku. Seega võib analüüside tulemused tõlgendada üldiselt usaldusväärseteks, üksikud suuremad kõrvalekalded võivad olla põhjustatud analüüsi tehnilisest läbiviimisest..

Väliste kvaliteedi hindamise programmide (nt ERNDIM) juurutamine aidanud kaasa biokeemilise testimise tulemuslikkuse parandamisele. Eelkõige on eesmärgiks analüüsides täpsuse, tõesuse, korratavuse kinnitamine ja laboratoorsete analüüsides harmoniseerimine. Lisaks on olulised meetodite valiidsus ja võrreldavus, mis puudutatavad laiendatud VS-t MS/MS meetodil, *cut-off* väärtuste kliinilisel valideerimisel ning mitme keskuse uuringutulemuste võrdlust (Fowler *et al.*, 2008).

ERNDIM programmis hinnati kokku kuut kontrollproovi ning võrreldi tulemuste tagasiside raportiga 2014. aastal. Raportis kajastatud kolmel proovil (selles töös on kasutatud kahe proovi tulemusi, sest ühe proovi haiguslik kõrvalekalle skriiningu paneelis ei esine) tuvastati diagnostilised kõrvalekalded. Tulemust interpreteeriti esialgselt metaboliitide arvulise väärtuse alusel võrreldes labori referentsväärtustega ning seejärel genereeriti ka kahtlust kinnitav või ümberlukkav vastus *Mayo Clinic*'u interpretatsiooni tööriista abil. Analüüsi 22b laboritulemustes selgunud kahtlust MCAD puudulikkusele kinnitas ka R4S rakendus ja ERNDIM tagasiside raport (vereplekk kuulus diagnoositud MCAD puudulikkusega patsiendile). Analüüsi 22c puhul jäi meie tulemustes tähelepanuta C3 kontsentratsiooni tõus, sest väärtus jäi referentsväärtuse alusel normivahemikku, C3 väärtus 2,73 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 0-4,69 $\mu\text{mol/L}$). Seega diagnoositi ekslikult võimalik CPT I esinemine PPA asemel kontrollproovis. Võib arvata, et C3 väärtuse tõus jäi tuvastamata proovi ettevalmistamisel tehtud vea tõttu. 2013. aastal sama proovi analüüsil raporteeriti samuti võimalik CPT I esinemine. C3 väärtus antud analüüsis oli 4,89 $\mu\text{mol/L}$ (referentsvahemik 2.81-6.91 $\mu\text{mol/L}$), mille alusel metaboliidi tõusu ei tuvastatud. Antud analüüsil põhines metaboliitide referentsvahemik *Chromsystems*'i soovitusel, mitte labori tulemustel. Kui seda

tulemust hinnata kuue kuu Eesti vastsündinute andmetel põhinevate protsentiilide alusel, siis on C3 referentsvahemik 0.34-4.63 $\mu\text{mol/L}$. Kasutades laboris määratud referentsväärtust, on C3 metaboliidi kontsentratsiooni tõus tuvastatav. Arvestades ka 15 kuu protsentiilide arvutusi, selgub, et C3 99-protsentiili väärtus langeb veelgi, olles 4.31 $\mu\text{mol/L}$, ning iseloomustab metaboliidi kontsentratsiooni selgemat tõusu kontrollproovis. See näitab, et pikemat perioodi arvestavad *cut-off* väärtused on laiemal põhjaga, arvestades ka faktoreid nagu ema toidulaud erinevatel aastaaegadel (oluline lapse ainevahetuse mõjutaja, mis põhjustab ka metaboliitide sisalduse varieeruvust vastsündinu veres) ja sekundaarsed terviserikked. Tänu sellele on *cut-off* väärtused objektiivsemad (Chapman *et al.*, 2008; Pitt, 2010). Lisaks tulevad selgemalt esile ka tehnoloogia eripärad (sisestandardite puudumine teatud metaboliitidel).

Skriiningu spetsiifilisust võib parandada mitmeti. *Cut-off* väärtuste väljatöötamine ja modifitseerimine on laborites levinud meetod (Lott *et al.*, 2004; Lindner *et al.*, 2006). Laiendatud VS pilootprojekti eesmärgiks oli ka Eesti populatsiooni põhjal ainevahetushaiguste indikaatormetaboliitide diagnostiliste väärtuste määramine. Sobivad metaboliitide kontsentratsioonide ning nende suhtarvude *cut-off* väärtused töötavad sõeltestimist teostavad laborid välja iseseisvalt. Metoodika sisetöötamisel on vaja vähemalt 2500-4000 proovi tulemusi, et määrata metaboliitide tasemed, millest alates loetakse analüüsi tulemused positiivseks. *Cut-off* väärtusi võrreldakse ka teiste keskustega. Neid on mõistlik aja jooksul modifitseerida, kui analüüsitud on rohkem vastsündinuid ning laboril on enam kogemusi positiivsete tulemuste identifitseerimisega (Rousseau *et al.*, 2012).

Diagnostiliselt olulisi otsusepiire arvutasime etapiviisiliselt. Algselt kasutasime *Chromsystem*'si meetodiga seotud väärtuseid (nende põhjal analüüsiti ka esimesed ERNDIM kontrollproovid), esimesed geneetikakeskuse *cut-off* väärtused arvutasime 1000 vastsündinu pealt, järgmised tulemused pilootprojekti osalenud ligi 6000 vastsündinu pealt ning aprillis 2015, pärast pilootprojekti lõppemist, enam kui 16 000 vastsündinu tulemusi arvesse võttes. Metaboliitide diagnostiliselt informatiivsete protsentiilide määramisel võtsime Eesti andmete koondtulemuste arvutustest välja oluliste metaboliitide kõrvalekalletega proovid, mis suunasime kordustestimisse, et välistada üldpopulatsiooni referentsvahemike määramisel patoloogilise kõrvalekaldega proovid. Samas jätsime sisse sekundaarsed kõrvalekalded, mis võivad potentsiaalselt viidata patoloogiale, kuid hetkel testimispaneeli ei kuulu. Eesmärk on diagnostiliselt informatiivset otsusepiiri mitte langetada liiga madalale, mis tooks kaasa suuremal arvul tagasikutsutud patsiente, FPR tõusu ning suurenenud koormuse sõeltestimise

programmile tervikuna. Vajadusel on tulemustest teavitatud vastsündinute vanemaid, erandjuhul raviarste ning kutsutud vastuvõtule või soovitatud teostada sekundaarsed uuringud.

15 kuu põhiste *cut-off* väärtuste võrdluses kuue kuu andmetega on kõige silmatorkavam erinevus *Chromsystems*'i poolt valideerimata ühendite puhul. 99-protsentilide tõusud: C16:1; C16:1OH; C16OH. Kõige enam on tõusnud C18:1OH ja C18:2OH vastavad väärtused. Kuue kuu tulemustes olid need mõlemad 0,09 µmol/L. 15 kuu arvutustes on väärtused vastavalt 0,17 µmol/L ja 0,15 µmol/L. Valideerimata metaboliitide tulemused muutuvad selgelt aja jooksul. Arvatavasti on piirväärtuste tõus tingitud MS/MS masina ionoptiliste parameetrite muutusest. Seega on aja möödudes vajalik üle vaadata valideerimata metaboliitide *cut-off* väärtused ja uuesti optimeerida parameetrid hüdroksürühma sisaldavatele atsüülkarnitiinidele (C3DC; C4OH; C4DC; C5:1; C5OH; C8:1, C10:1; C14:2; C14:1; C14:OH; C16:1; C16:OH; C16:1OH; C18:1; C18:1OH; C18:2OH; C18OH).

Laiendatud sõeltestimise laboratoorse efektiivsuse hindamiseks on olulised parameetrid analüüsi FPR ning PPV. Teatav valepositiivsete tulemuste hulk on laiendatud VS programmides paratamatu. Fenomeni põhjustab suur arv haruldasi haigusi, mis on skriiningu paneelidesse lisatud (Rousseau *et al.*, 2012). Ehkki erinevate riikide programmide tulemused varieeruvad, on seatud tunnustatud analüütilised ja post-analüütilised eesmärgid: FPR <0,3% ja PPV >20% (Rinaldo *et al.*, 2006). Erinevad riigid on avaldanud koondtulemusi, kus FPR on 0,02-0,38% (Wiley *et al.*, 1999; Wilcken *et al.*, 2003 ja 2009; Schulze *et al.*, 2003; Zytkovicz *et al.*, 2001; Frazier *et al.*, 2006; Vilarinho *et al.*, 2010).

Eestis läbi viidud pilootprojekti puhul oli FPR 0,18%. FPR varieerus periooditi: esimese kuue kuu lõikes oli FPR 0,28% ning teisel poolaastal 0,1%. 2015. aasta esimese kolme kuuga langes FPR 0,06%-ni. FPR vähenemine kogemuse kasvades iseloomustab ka teiste riikide praktikat. Taanis 2002-2011 läbiviidud pilootuuringu ja riikliku programmi tulemustest lähtub, et skriiningu esimesel aastal saavutati FPR 0,06% ja seda suudeti langetada 0,03%-ni viimase aasta jooksul (kogu programmi lõikes FPR 0,038%) (Lund *et al.*, 2012). Novembrist 2010 kuni juunini 2012 pilootprojekti läbi viinud Rootsi andmetest lähtub, et kui tervikuna perioodi FPR oli 0,067% ja PPV 45%, siis projekti viimase kuue kuu jooksul langes FPR 0,047%-ni ja PPV tõusis 49%-ni (Engvall *et al.*, 2012). Seega on ootuspärane tulemus, et *cut-off* väärtuste korrigeerimine projekti vältel aitab protsessi muuta efektiivsemaks ning täpsemaks. Tulemustes näeme trendi FPR vähenemiseks ja PPV tõusuks. FPR väärtus ja PPV iseloomustavad nii skriiningu programmi tervikuna kui ka selles sisalduvaid haigusi

eraldiseisvalt. Nii on erinevate haiguste vastavad väärtused erinevad (Wilcken *et al.*, 2003). Geneetikakeskuse pilootprojekti koondtulemustes me ei ole eraldi välja toodud leitud haiguste vastavaid väärtusi ega hinnanud esinemissagedust Eesti vastsündinute seas – seda põhjusel, et 16 000 vastsündinu pealt ei ole võimalik leida avastatud kõrvalekallete täpset esinemissagedust ja programmi efektiivsuse parameetreid usaldusväärselt.

Madalama esinemissagedusega haiguste puhul on kompetentsi tagamiseks oluline riiklik (juhul, kui skriiningut viivad läbi mitmed laborid) ja rahvusvaheline koostöö (Kölker *et al.*, 2006 ja 2007). Interpretatsiooni tööriist koostööprojekti R4S raames võimaldab suurendada PPV-d ning langetada FPR-i, säilitades samal ajal piisavalt kõrge tundlikkuse (Marguardt, *et al.*, 2012), sest ainevahetushaiguse kahtlusega tulemusi saab võrrelda enam kui 33 miljoni sisestusega laboritest üle maailma. Üldpopulatsiooni normivahemike põhjal *cut-off* väärtusi määrares tõstatub probleem, et suurem osa sõeltestimise programme ei puutu praktikas kokku 30-80% haigustega, mis on nende skriiningu paneelis (McHugh *et al.*, 2011). Eriti oluline on see faktor väiksemates programmides, kus testitakse vähem vastsündinuid. Arvestades Eesti aastast vastsündinute arvu (ca 13 000), on selge, et võimekus kinnitada väga madala esinemissagedusega haiguste puhul populatsioonipõhiseid normivahemikke ei ole niivõrd lühikese aja jooksul piisav. Samuti on keeruline tagada äärmiselt harvaesinevate haigusjuhtude piisavalt efektiivne identifitseerimine.

Töö tulemuste põhjal saab teha kolm peamist järeldust:

1. Väliste kvaliteedi hindamise ERNDIM programmi tulemustes on SA TÜK ühendlabori geneetikakeskuses esinenud 2014.a. üks mittevastavus. Väliste kvaliteedi kontrolli tulemuste kriitiline hindamine on parandanud VS biokeemilise testimise kvaliteeti.
2. VS skriiningus kasutatavate otsusepiiride puhul vajab kasutatav MS/MS metoodika pidevat jälgimist ja optimeerimist, eelkõige valideerimata (hüdrosü)metaboliitide osas.
3. Esimese 15 kuu jooksul kinnitus päriliku või kaasasündinud ainevahetushaiguse diagnoos 9 patsiendil (1:1882 vastsündinu kohta). FPR oli 0.18% ja PPV 25%. FPR vähenes ja PPV hulk tõusis 2015.a esimese 3 kuu jooksul 2014. aasta esimese 6 kuu ning pilootprojekti koondtulemustega võrreldes.

KOKKUVÕTE

Kaasasündinud ainevahetushaigused on geneetilised häired, mida põhjustab kindla keemilise reaktsiooni kõrvalekalle ainevahetusrajas, haiguste grupi üldine esinemissagedus on kuni 1:2500 vastsündinu kohta. Haiguste kliiniline pilt on väga varieeruv, haigused võivad avalduda juba vastsündinu eas, aga ka täiskasvanutel, ning tekitada arengule pöördumatut kahju.

VS on mitmesuguste kaasasündinud haiguste testimine, et tagada patsientidele ravi alustamine haiguse asümptomaatilises või varases perioodis. VS töötati välja 1960. aastatel, algselt PKU tuvastamiseks. Hiljem on lisatud VS paneelidesse uusi haigusi, kuid kuna iga analüüs vajab eraldi meetodikat, arenes valdkond aeglaselt. Tormiline areng toimus tänu MS/MS meetodika rakendamisele, mis võimaldab testida vastsündinuid ühe analüüsi käigus kümnete erinevate ainevahetushaiguste suhtes. Paljud riigid on juurutanud laiendatud sõeltestimise programmid. 2014. aastal viidi SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabori geneetikakeskuses läbi laiendatud skriiningu pilootprojekt, mille raames hakati Eesti vastsündinuid testima lisaks PKU-le ja CH-le veel 18 ainevahetushaiguse suhtes. Esimese 15 kuu jooksul skriinit 16 938 vastsündinut, kinnitatud positiivse diagnoosi sai 9 vastsündinut (FPR 0,18%, PPV 24%). Antud magistritöös hinnati VS meetodi usaldusväärsust ja tulemuslikkust laborisisesest kvaliteedi hindamise ning rahvusvahelise ERNDIM kontrollproovide analüüsil. Pilootprojekti koondtulemuste põhjal hinnati programmi laiemaid tulemuslikkuse parameetreid. Lisaks määrati pilootprojekti ning 2015. aasta esimese kolme kuu vastsündinute tulemuste põhjal metaboliitide normivahemikke ja haiguslikke kõrvalekaldeid iseloomustavad protsentiilide väärtused.

Laborisisesest kontrolli tulemustest võib järeldada, et analüüsi teostamine kasutatud meetodi tingimustel on efektiivne ja usaldusväärne. Võrdluskatsete tulemused kinnitavad meetodi suutlikkust proovidest kõrvalekaldeid tuvastada. Kuid tähelepanu tuleb pöörata proovide ettevalmistamise täpsusele ning tulemuste interpreteerimisel kasutada laboris sisse töötatud *cut-off* väärtusi. Välise kvaliteedi kontrolli tulemuste kriitiline hindamine on parandanud VS biokeemilise testimise kvaliteeti. VS skriiningus kasutatavate otsusepiiride puhul vajab kasutatav MS/MS meetodika pidevat jälgimist ja optimeerimist. Projekti koondtulemustes on märgata selget FPR osakaalu vähenemist ning PPV kasvu. Üldistused haiguste täpsete esinemissageduste ja programmi tulemuslikkuse kohta vajavad pikemat kogemust ning ajaraami. Leiame, et projekti tuleb kindlasti jätkata.

Expanded newborn screening for inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry

Ursula Ilo

SUMMARY

Inborn Errors of Metabolism (IEM) are genetic disorders caused by alterations of a specific biochemical reaction in metabolism. Although individually rare, they collectively account for a significant proportion of illnesses, particularly in children. The overall prevalence varies between regions, but is estimated that about 1:2500 newborns is affected. IEM can be pleiotropic and can involve virtually any organ or system. Initial clinical presentation can occur any time from prenatal development through adulthood. The primary aim of early detection and treatment of clinically important disorders is to minimize morbidity and mortality in early childhood as well as long-term consequences of the condition. The foundations population based newborn screening (NBS) programs stem from the work of Robert Guthrie in the 1960s when systematic screening identified, within the first days of life, babies with phenylketonuria.

The introduction of the analysis of acylcarnitines and amino acids by tandem mass spectrometry (MS/MS) to population based NBS has tremendously increased the number of detectable IEM-s amenable to intervention. Several countries have already implemented expanded screening programs, testing more than 20 metabolic conditions.

In the beginning of 2014 Estonia introduced screening for 19 IEM by MS/MS as a pilot study. In the first 15 months of screening, a total of 16 938 newborns were screened and 9 confirmed cases detected (1:1882 newborns affected; FPR 0.18%; PPV 24%).

The aims of the present study were to verify the MS/MS method in the clinical laboratory carrying out the NBS program by performing both internal and external quality assurance studies in order to ensure the robustness and performance of the analytical method and the overall analytical process in the specific context of a physical laboratory facility. In addition, we established cut-off values for detection of metabolites of interest based on the results of the first 15 months of screening.

Internal quality assurance studies suggest that performing newborn screening at given analytical conditions is sufficiently robust and reliable. Results from external quality assurance program ERNDIM suggest that the method detects alterations in metabolite concentration from test samples, but sample preparation conditions need to be precisely monitored and the interpretation of the results has to be based on cut-off values established in the laboratory facility to ensure precision. Establishing cut-off values based on a larger cohort (6000 newborns vs 16000 newborns) helps to increase objectivity in the interpretation of the results. The notable changes in some cut-off values (e.g. analysing metabolites without validated internal standards) indicate the need to consider the technological specifications as well as optimize the analytical conditions and cut-off values over time.

The results of the pilot of study and first 15 months of expanded newborn screening for IEM in Estonia indicate notable decline in false positive rate (0.28% in the first 6 months; 0.1% in the second 6 months and 0.16% overall) and increase in positive predictive value (18% in the first 6 months; 36% in the second 6 months and 25% overall) Results regarding IEM prevalence and overall efficacy of the program need more substantial experience in longer time frame.

TÄNUAVALDUSED

Soovin tänada oma juhendajaid Katrin Õunapit, Kadi Künnapast, Karit Reinsoni ja Neeme Tõnissoni, kes andsid mulle võimaluse teha magistritöö väga huvitaval teemal ning olid töö kirjutamisel alati abivalmid, toetavad ning vajadusel ka kriitilised.

Lisaks tänan SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabori geneetikakeskuse ainevahetushaiguste labori kollektiivi abi ja kannatlikkuse eest töö praktilise osa läbiviimisel.

Antud projekti on toetatud Eesti Teadusagentuuri PUT0355 personaalsest uuringutoetusest ja SA TÜK ühendlabori poolt.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

Abhyankar, S., Lloyd-Puryear, M.A., Goodwin, R., Copeland, S., Eichwald, J., Therrell, B.L., Zuckerman, A., Downing, G., McDonald, C.J., (2010), „Standardizing newborn screening results for health information exchange“, AMIA Annual Symposium Proceedings, 2010: 1–5

Allard, P., Grenier, A., Korson, M.S., Zytkevich, T.H., (2004), „Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia by tandem mass spectrometry: analysis of succinylacetone extracted from dried blood spots“, *Clinical Biochemistry*, 37:1010–5

American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group, (2006), „Newborn screening: Toward a Uniform Screening Panel and System – Executive Summary“, *Pediatrics*, 117:296–307

Andermann, A., Blancaquaert, I., Beauchamp, S., Dery, V., (2008), „Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years, *Bull World Health Organisation*, 86(4):317-9

Andresen, B.S., Dobrowolski, S.F., O'Reilly, L., Muenzer, J., McCandless, S.E., Frazier, D.M., Udvari, S., Bross, P., Knudsen, I., Banas, R., Chace, D.H., Engel, P., Naylor, E.W., Gregersen, N., (2001), „Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) mutations identified by MS/MS-based prospective screening of newborns differ from those observed in patients with clinical symptoms: identification and characterization of a new, prevalent mutation that results in mild MCAD deficiency“, *American Journal of Medical Genetics*, 68(6):1408-18

Applegarth, D.A., Dimmick, J.E., Toone, J.R., (1989), „Laboratory detection of metabolic disease“, *Pediatric Clinics of North America*, 36(1):49-65

Applegarth, D.A., Toone, J.R., Lowry, R.B., (2000), „Incidence of inborn errors of metabolism in British Columbia, 1969–1996“, *Pediatrics*, 105:10

Blau, N., Leonard, J., Hoffmann, G.F., Clarke, J.T.R., (2006), „Physician's guide to the treatment and follow-up of metabolic diseases, 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag

Bodamer, O.A., Hoffmann, G.F., Lindner, M., (2007), „Expanded newborn screening in Europe 2007“, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30:439-444

Carlson, M.D., (2004), „Recent advances in newborn screening for neurometabolic disorders“, *Current Opinions in Neurology*, 17:133–138

Carpenter, K., Wiley, V., Sim, K.G., Heath, D., Wilcken, B., (2001), „Evaluation of newborn screening for medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in 275 000 babies“, *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal*, 85(2):F105-9

Chace, D.H., Millington, D.S., Terada, N., Kahler, S.G., Roe, C.R., Hofman, L.F., (1993), „Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry“, *Clinical Chemistry*, 39:66-71

Chace, D.H., Hillman, S.L., Millington, D.S., Kahler, S.G., Roe, C.R., Naylor, E.W., (1995), „Rapid diagnosis of maple syrup urine disease in blood spots from newborns by tandem mass spectrometry“, *Clinical Chemistry*, 41:62-68

Chace, D.H., Kalas, T.A., Naylor, E.W., (2002), „The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism“, *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 3:17-45

Chace, D.H., Kalas, T.A., Naylor, E.W., (2003), „Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns“, *Clinical Chemistry*, 49(11):1797-817

Chace, D.H., Kalas, T.A., (2005), A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing, *Clinical Biochemistry*, 38(4):296-309

Chace, D.H., (2009), „Mass spectrometry in newborn and metabolic screening: historical perspective and future directions“, *Journal of Mass Spectrometry*, 44, 163–170

Chapman, K.A., Ganesh, J., Ficicioglu, C., (2008), „A false-positive newborn screening result: goat's milk acidopathy“, *Pediatrics*, 122(1):210-1

- Dantas, M.F., Suormala, T., Randolph, A., Coelho, D., Fowler, B., Valle, D., Baumgartner, M.R., (2005), „3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: mutation analysis in 28 probands, 9 symptomatic and 19 detected by newborn screening“, *Human Mutation*, 26(2):164
- De Jesus, V.R., Chace, D.H., Lim, T.H., Mei, J.V., Hannon, W.H., (2010), „Comparison of amino acids and acylcarnitines assay methods used in newborn screening assays by tandem mass spectrometry“, *Clinical Chimica Acta*, 411,(9-10):684-9
- Denne, S.C., Karn, C.A., Ahlrichs, J.A., Dorotheo, A.R., Wang, J., Liechty, E.A., (1996), „Proteolysis and phenylalanine hydroxylation in response to parenteral nutrition in extremely premature and normal newborns“, *Journal of Clinical Investigation*, 1;97(3):746-54
- Dhillon, K.S., Bhandal, A.S., Aznar, C.P., Lorey, F.W., Neogi, P., (2011), „Improved tandem mass spectrometry (MS/MS) derivatized method for the detection of tyrosinemia type I, amino acids and acylcarnitine disorders using a single extraction process“, *Clinical Chimica Acta*, 12;412(11-12
- Dietzen, D.J., Rinaldo, P., Whitley, R.J., Rhead, W.J., Hannon, W.H., Garg, U.C., et al. (2009), “National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: Follow-up testing for metabolic disease identified by expanded newborn screening using tandem mass spectrometry; executive summary,” *Clinical Chemistry*, 55:1615–1626
- Dipple, K.M., McCabe, E.R., (2000), “Modifier genes convert “simple” Mendelian disorders to complex traits,” *Molecular Genetics in Metabolism*, 71:43-50
- Eesti Haigekassa, (2012), „Haiguste ennetamise tegevuskava aastaks 2012“
- Efron, M.L., Young, D., Moser, H.W., Maccready, R.A., (1964), „A simple chromatographic screening test for the detection of disorders of amino acids metabolism. A technic using whole blood or urine collected on filter paper“, *New England Journal of Medicine*, 270:1378-83
- Engvall, M.L., Zetterstrom, R.H., Ahlman, H., Ohlsson, A., Guthenberg, C., Rinaldo, P., von Döbeln, U., (2012). „Experiences from implementation of national expanded newborn screening in Sweden“, (avaldamata andmed)
- Fowler, B., Burlina, A., Kozich, V., Vianey-Saban, C., (2008), Quality of analytical performance in inherited metabolic disorders: the role of ERNDIM, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 31(6):680-91ot
- Franzson, L., (2012), „Newborn screening of rare diseases in Iceland and other Nordic countries“, Nordic Conference on Rare Diseases (konverentsi ettekanne)
- Frazier, D.M., Millington, D.S., McCandless, S.E., Koeberl, D.D., Weavil, S.D., Chaing, S.H., Muenzer, J, (2006), „The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997–2005“, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29:76–85
- Gan-Schreier, H., Kebbewar, M., Fang-Hoffmann, J., Wilrich, J., Abdoh, G., Ben-Omran, T., Shahbek, N., Bener, A., Al Rifai, H., Al Khal, A.L., Lindner, M., Zschocke, J., (2010), „Newborn population screening for classic homocystinuria by determination of total homocysteine from Guthrie cards“, *Journal of Pediatrics*, 156:427-432
- Garg, U. ja Dasouki, M., (2006), „Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: clinical and laboratory aspects“, *Clinical Biochemistry*, 39(4):315-32
- Garrod, A., (1908), „The coonian lectures on inborn errors of metabolism, lecture II: alkaptonuria“, *Lancet*, 2:73-79
- Grosse, S.D., Boyle, C.A., Kenneson, A., Khoury, M.J., Wilfond, B.S., (2006), „From public health emergency to public health service: the implications of evolving criteria for newborn screening panels“, *Pediatrics*, 117(3):923-9
- Guthrie, R., Susi, A., (1963), „A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants“, *Pediatrics*, 32:338–343

- Hall, P.L., Marquardt, G., McHugh, D.M.S., Currier, R.J., Tang, H., Stoway, S., Rindaldo, P., (2014), „Postanalytical tools improve performance of newborn screening by tandem mass spectrometry,“ *Genetics in Medicine*, 16:889-895
- Holtzman, N.A., (2003), Expanding newborn screening: how good is the evidence?, *JAMA*, 290(19):2606–8
- Joost, K., Õunap, K., Žordania, R., et al., (2012), Prevalence of Long-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase Deficiency in Estonia,“ *Journal of Inherited Metabolic Disease Rep*, 2:79–85
- Koeberl, D.D., Millington, D.S., Smith, W.E., Weavil, S.D., Muenzer, J.M., McCandless, S.E., Kishnani, P.S., McDonald, M.T., Chaing, S., Boney, A., Moore, E., Frazier, D.M., (2003), Evaluation of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening,“ *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 26(1):25-35
- Kölker, S., Garbade, S.F., Greenberg, C.R., Leonard, J.V., Saudubray, J.M., Ribes, A., Kalkanoglu, H.S., Lund, A.M., Merinero, B., Wajner, M., Troncoso, M., Williams, M., Walter, J.H., Campistol, J., Martí-Herrero, M., Caswill, M., Burlina, A.B., Lagler, F., Maier, E.M., Schwahn, B., Tokatli, A., Dursun, A., Coskun, T., Chalmers, R.A., Koeller, D.M., Zschocke, J., Christensen, E., Burgard, P., Hoffmann, G.F., (2006), „Natural history, outcome, and treatment efficacy in children and adults with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency,“ *Pediatric Research*, 59:840-847
- Kölker, S., Garbade, S.F., Boy, N., Maier, E.M., Meissner, T., Mühlhausen, C., Hennermann, J.B., Lücke, T., Häberle, J., Baumkötter, J., Haller, W., Müller, E., Zschocke, J., Burgard, P., Hoffmann, G.F., (2007), „Decline of acute encephalopathic crises in children with glutaryl-CoA dehydrogenase deficiency identified by newborn screening in Germany,“ *Pediatric Research*, 62:357-363
- la Marca, G., Malvagias, S., Pasquini, E., et al., (2008), „The inclusion of succinylacetone as marker for tyrosinemia type I in expanded newborn screening programs. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22:812–8
- Lanpher, B., Brunetti-Pierri, N., Lee, B., (2006), „Inborn errors of metabolism: the flux from Mendelian to complex diseases,“ *Nature Reviews Genetics*, 7(6):449-60
- Lee, H.C., Mak, C.M., Lam, C.W., Yuen, Y.P., Chan, A.O., Shek, C.C., et al., (2011), „Analysis of inborn errors of metabolism: Disease spectrum for expanded newborn screening in Hong Kong, „*Chinese Medical Journal (Engl)*, 124:983–9
- Lehotay, D.C., Hall, P., Lepage, J., Eichhorst, J.C., Etter, M.L., Greenberg, C.R., (2011), „LC-MS/MS progress in newborn screening,“ *Clinical Biochemistry*, 44:21-31
- Levy, H.L., Coulombe, J.T., Shih, V.E., (1980), „Newborn urine screening,“ Bickel H Guthrie R Hammersen G eds. *Neonatal screening for inborn errors of metabolism*: 89-103 Springer-Verlag Berlin
- Levy, H.L., (1998), „Newborn screening by tandem mass spectrometry: a new era,“ *Clinical Chemistry*, 44(12):2401-2
- Lindner, M., Ho, S., Fang-Hoffmann, J., Hoffmann, G.F., Kölker, S., „Neonatal screening for glutaric aciduria type I: strategies to proceed,“ *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29(2-3):378–82
- Lindner, M., Abdoh, G., Fang-Hoffmann, J., Shabeck, N., Al-Sayrafi, M., Al-Janahi, M., et al., (2007), „Implementation of extended neonatal screening and a metabolic unit in the State of Qatar: Developing and optimizing strategies in cooperation with the Neonatal Screening Center in Heidelberg,“ *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30:522–529
- Lindner, M., Ho, S., Kölker, S., Abdoh, G., Hoffmann, G.F., Burgard, P., (2008), „Newborn screening for methylmalonic acidurias--optimization by statistical parameter combination,“ *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 31:379–85
- Lindner, M., Gramer, G., Haege, G., Fang-Hoffmann, J., Schwab, K.O., Tacke, U., Trefz, F.K., Mengel, E., Wendel, U., Leichsenring, M., Burgard, P., Hoffmann, G.F., (2011), „Efficacy and outcome of expanded newborn screening for metabolic diseases — report of 10 years from South-West Germany,“ *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 6:44

Loeber, J.G., Burgard, P., Cornel, M.C., et al., (2012), “Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 1. From blood spot to screening result,” *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35:603–11

Lott, J.A., Sardovia-Iyer, M., Speakman, K.S., Lee, K.K., (2004), “Age-dependent cutoff values in screening newborns for hypothyroidism,” *Clinical Biochemistry*, 37(9):791–7

Lund, A.M., Hougaard, D.M., Simonsen, H., Andresen, B.S., Christensen, M., Dunø, M., Skogstrand, K., Olsen, R.K., Jensen, U.G., Cohen, A., Larsen, N., Saugmann-Jensen, P., Gregersen, N., Brandt, N.J., Christensen, E., Skovby, F., Nørgaard-Pedersen, B.. (2012), “Biochemical screening of 504,049 newborns in Denmark, the Faroe Islands and Greenland--experience and development of a routine program for expanded newborn screening,” *Molecular Genetics in Metabolism*, 107(3):281–93

Magera, M.J., Gunawardena, N.D., Hahn, S.H., Tortorelli, S., Mitchell, G.A., Goodman, S.I., et al., (2006), “Quantitative determination of succinylacetone in dried blood spots for newborn screening of tyrosinemia type I,” *Molecular Genetics in Metabolism*, 88:16–21

Marquardt, G., Currier, R., McHugh, D.M., et al. (2012), “Enhanced interpretation of newborn screening results without analyte cutoff values,” *Genetics in Medicine*, 14:648–655

Marquardt, G., Currier, R., McHugh, D.M., Gavrilov, D., Magera, M.J., Matern, D., Oglesbee, D., Raymond K, Rinaldo P, Smith EH, Tortorelli S, Turgeon CT, Lorey F, Wilcken B, Wiley V, Greed LC, Lewis B, Boemer F, Schoos R, Marie S, Vincent MF, Sica YC, Domingos MT, Al-Thihli K, Sinclair G, Al-Dirbashi OY, Chakraborty P, Dymerski M, Porter C, Manning A, Seashore MR, Quesada J, Reuben A, Chrastina P, Hornik P, Atef Mandour I, Atty Sharaf SA, Bodamer O, Dy B, Torres J, Zori R, Cheillan D, Vianey-Saban C, Ludvigson D, Stemberge A, Bonham J, Downing M, Dotsikas Y, Loukas YL, Papakonstantinou V, Zacharioudakis GS, Baráth Á, Karg E, Franzson L, Jonsson JJ, Breen NN, Lesko BG, Berberich SL, Turner K, Ruoppolo M, Scolamiero E, Antonozzi I, Carducci C, Caruso U, Cassanello M, la Marca G, Pasquini E, Di Gangi IM, Giordano G, Camilot M, Teofoli F, Manos SM, Peterson CK, Mayfield Gibson SK, Sevier DW, Lee SY, Park HD, Khneisser I, Browning P, Gulamali-Majid F, Watson MS, Eaton RB, Sahai I, Ruiz C, Torres R, Seeterlin MA, Stanley EL, Hietala A, McCann M, Campbell C, Hopkins PV, de Sain-Van der Velden MG, Elvers B, Morrissey MA, Sunny S, Knoll D, Webster D, Frazier DM, McClure JD, Sesser DE, Willis SA, Rocha H, Vilarinho L, John C, Lim J, Caldwell SG, Tomashitis K, Castiñeiras Ramos DE, Cocho de Juan JA, Rueda Fernández I, Yahyaoui Macías R, Egea-Mellado JM, González-Gallego I, Delgado Pecellin C, García-Valdecasas Bermejo MS, Chien YH, Hwu WL, Childs T, McKeever CD, Tanyalcin T, Abdulrahman M, Queijo C, Lemes A, Davis T, Hoffman W, Baker M, Hoffman, G.L., (2012), “Enhanced interpretation of newborn screening results without analyte cutoff values, *Genetics in Medicine*, 14(7):648–55

Marshall, E., (2002), “Fast technology drives new world of newborn screening,” *Science*, 294:2272–2274

McHugh, D., Cameron, C.A., Abdenur, J.E., Abdulrahman, M., Adair, O., Al Nuaimi, S.A., Åhlman, H., Allen JJ, Antonozzi I, Archer S, Au S, Auray-Blais C, Baker M, Bamforth F, Beckmann K, Pino GB, Berberich SL, Binard R, Boemer F, Bonham J, Breen NN, Bryant SC, Caggana M, Caldwell SG, Camilot M, Campbell C, Carducci C, Bryant SC, Caggana M, Caldwell SG, Camilot M, Campbell C, Carducci C, Cariappa R, Carlisle C, Caruso U, Cassanello M, Castilla AM, Ramos DE, Chakraborty P, Chandrasekar R, Ramos AC, Cheillan D, Chien YH, Childs TA, Chrastina P, Sica YC, de Juan JA, Colandre ME, Espinoza VC, Corso G, Currier R, Cyr D, Czuczy N, D'Apolito O, Davis T, de Sain-Van der Velden MG, Delgado Pecellin C, Di Gangi IM, Di Stefano CM, Dotsikas Y, Downing M, Downs SM, Dy B, Dymerski M, Rueda I, Elvers B, Eaton R, Eckerd BM, El Mougy F, Eroh S, Espada M, Evans C, Fawbush S, Fijolek KF, Fisher L, Franzson L, Frazier DM, Garcia LR, Bermejo MS, Gavrilov D, Gerace R, Giordano G, Irazabal YG, Greed LC, Grier R, Grycki E, Gu X, Gulamali-Majid F, Hagar AF, Han L, Hannon WH, Haslip C, Hassan FA, He M, Hietala A, Himstedt L, Hoffman GL, Hoffman W, Hoggatt P, Hopkins PV, Hougaard DM, Hughes K, Hunt PR, Hwu WL, Hynes J, Ibarra-González I, Ingham CA, Ivanova M, Jacox WB, John C, Johnson JP, Jónsson JJ, Karg E, Kasper D, Kloppe B, Katakouzinos D, Khneisser

I, Knoll D, Kobayashi H, Koneski R, Kozich V, Kouapei R, Kohlmüller D, Kremensky I, la Marca G, Lavochkin M, Lee SY, Lehotay DC, Lemes A, Lepage J, Lesko B, Lewis B, Lim C, Linard S, Lindner M, Lloyd-Puryear MA, Lorey F, Loukas YL, Luedtke J, Maffitt N, Magee JF, Manning A, Manos S, Marie S, Hadachi SM, Marquardt G, Martin SJ, Matern D, Mayfield Gibson SK, Mayne P, McCallister TD, McCann M, McClure J, McGill JJ, McKeever CD, McNeilly B, Morrissey MA, Moutsatsou P, Mulcahy EA, Nikoloudis D, Norgaard-Pedersen B, Oglesbee D, Oltarzewski M, Ombrone D, Ojodu J, Papakonstantinou V, Reoyo SP, Park HD, Pasquali M, Pasquini E, Patel P, Pass KA, Peterson C, Pettersen RD, Pitt JJ, Poh S, Pollak A, Porter C, Poston PA, Price RW, Queijo C, Quesada J, Randell E, Ranieri E, Raymond K, Reddic JE, Reuben A, Ricciardi C, Rinaldo P, Rivera JD, Roberts A, Rocha H, Roche G, Greenberg CR, Mellado JM, Juan-Fita MJ, Ruiz C, Ruoppolo M, Rutledge SL, Ryu E, Saban C, Sahai I, García-Blanco MI, Santiago-Borrero P, Schenone A, Schoos R, Schweitzer B, Scott P, Seashore MR, Seeterlin MA, Sesser DE, Sevier DW, Shone SM, Sinclair G, Skrinka VA, Stanley EL, Strovel ET, Jones AL, Sunny S, Takats Z, Tanyalcin T, Teofoli F, Thompson JR, Tomashitis K, Domingos MT, Torres J, Torres R, Tortorelli S, Turi S, Turner K, Tzanakos N, Valiente AG, Vallance H, Vela-Amieva M, Vilarinho L, von Döbeln U, Vincent MF, Vorster BC, Watson MS, Webster D, Weiss S, Wilcken B, Wiley V, Williams SK, Willis SA, Woontner M, Wright K, Yahyaoui R, Yamaguchi S, Yssel M, Zakowicz W.M., (2011), "Clinical validation of cutoff target ranges in newborn screening of metabolic disorders by tandem mass spectrometry: a worldwide collaborative project," *Genetics in Medicine*, 13(3):230–54

Matern, D., Tortorelli, S., Oglesbee, D., Gavrilov, D., Rinaldo, P., (2007), "Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of MS/MS-based second-tier tests: the Mayo Clinic experience (2004-2007)" *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(4):585–92

Merritt, J.L., Vedal, S., Abdenur, J.E., et al., "Infants suspected to have very-long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency from newborn screening," *Molecular Genetics and Metabolism*, 111:484–492

Metcalfe, S.A., Bittles, A.H., O'Leary, P., Emery, J., (2009), "Australia: Public Health Genomics," *Public Health Genomics*, 12:121-128

Metz, T.F., Mechtler, T.P., Merk, M., Gottschalk, A., Lukačín, R., Herkner, K.R., Kasper, D.C., (2011), „Evaluation of a novel, commercially available mass spectrometry kit for newborn screening including succinylacetone without hydrazine," *Clinical Chimica Acta*, 413(15-16):1259-64

Mikelsaar, R.V., Zordania, R., Viikmaa, M., Kudrjavitseva, G., (1998), „Neonatal screening for congenital hypothyroidism in Estonia, *Journal of Medical Screening*, 5:20–21

Paul, D.B., (1997), „The history of phenylketonuria screening in the US," Watson MS, editor. Promoting safe and effective genetic testing in the United States: final report on the task force on genetic testing. Bethesda: National Institutes of Health

Paul, D.B., (2008), „Patient advocacy in newborn screening: Continuities and discontinuities," American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics, 148:8-14

Pettersen, R.D., (2012), „Expanded newborn screening in Norway," 8th ISNS European Neonatal Screening Regional Meeting in Budapest (konverentsietekanne)

Pitt, J.J., (2010), "Newborn screening," *Clinical Biochemistry Reviews*, 31:57–68

Plass, A.M., van El, C. G., Pieters, T., Cornel, M.C., (2010), "Neonatal screening for treatable and untreatable disorders: Prospective parents' opinions," *Pediatrics*, 125:99–106

Pollak, A, Kasper, D.C., (2013), "Austrian Newborn Screening Program: a perspective of five decades," *Journal of Perinatal Medicine*, 42(2):151–158

Pollitt, R.J., (2006), "International perspectives on newborn screening," *Journal of Inherited Metabolic Disease* 29:390-396

Pollitt, R.J., (2007), "Introducing new screens: Why are we all doing different things?" *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, 30:423-429

Pourfarzam, M., Zadhoush, F., (2013), „Newborn Screening for inherited metabolic disorders; news and views,“ *Journal of Research in Medical Science*, 18(9):801-808

President's Council on Bioethics, (2008), „The Changing Moral Focus of Newborn Screening, President's Council on Bioethics,“ Washington, DC

Prosser, L.A., Kong, C.Y., Rusinak, D., Waisbren, S.L., (2010), „Projected costs, risks, and benefits of expanded newborn screening for MCADD,“ *Pediatrics*, 125:e286–94

Rashed, M.S., Ozand, P.T., Bucknall, M.P., Little, D., (1995), „Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry,“ *Pediatric Research*, 38(3):324-31

Rhead, W.J., Allain, D., Van Calcar, S., et al. (2002), „Short chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCC) deficiencies: tandem mass spectrometry newborn screening detects many clinically benign cases,“ *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 25:1-4

Rhead, W.J., (2006), „Newborn screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a global perspective,“ *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29(2-3):370-7

Rinaldo, P., Zafari, S., Tortorelli, S., Matern, D., (2006), “Making the case for objective performance metrics in newborn screening by tandem mass spectrometry,” *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Review*, 12:255–61

Rousseau, F., Giguère, Y., Berthier, M.T., Guérette, D., Girard, J.G., Déry, M., (2012), „Newborn Screening By Tandem Mass Spectrometry: Impacts, Implications and Perspectives,“ *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*, Dr Jeevan Prasain (Ed.)

Sander, J., Janzen, N., Peter, M., Sander, S., Steuerwald, U., Holtkamp, U., et al., (2006), “Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia: tandem mass spectrometric quantification of succinylacetone,” *Clinical Chemistry*, 52:482–7.

Schulze, A., Lindner, M., Kohlmüller, D., Olgemöller, K., Mayatepek, E., Hoffmann, G.F., (2003), “Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: Results, outcome, and implications,” *Pediatrics*, 111:1399–1406

Scriver, C.R., Davies, E., Cullen, A.M., (1964), “Application of a simple micromethod to the screening of plasma for a variety of aminoacidopathies,” *Lancet*, 2(7353):230-2

Turgeon, C., Magera, M.J., Allard, P., et al., (2008), “Combined newborn screening for succinylacetone, amino acids, and acylcarnitines in dried blood spots,” *Clinical Chemistry*, 54:657–64

U.S. Congress, Office of Technology Assessment, (1988), “Healthy children: investing in the future, Washington, D.C.: Government Printing Office

Uudelepp, M.-L., Joost, K., Žordania, R., Õunap, K., (2012), “Fenüülketonuuria Eesti ravijuhend,” *Eesti Arst*, 91:46–51

Venditti, L.N., Venditti, C.P., Berry, G.T., Kaplan, P.B., Kave, E.M, Glick, H, Stanley, C.A., (2003), “Newborn screening by tandem mass spectrometry for medium-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a cost-effectiveness analysis,” *Pediatrics*, 112(5):1005-15

Vilarinho, L., Rocha, H., Sousa, C., Marcao, A., Fonseca, H., Bogas, M., Osorio, R.V., (2010), “Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry”, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33:133-138

Waisbren, S.E., Albers, S., Amato, S., Ampola, M., Brewster, T.G., Demmer, L., Eaton, R.B., Greenstein, R., Korson, M., Larson, C., Marsden, D., Msall, M., Naylor, E. W., Pueschel, S., Seashore, M., Shih, V.E., Levy, H. L., (2003), Effect of expanded newborn screening for biochemical genetic disorders on child outcomes and parental stress, *JAMA*, 290(19):2564–72

Waisbren, S.E., (2008), “Expanded newborn screening: Information and resources for the family physician,” *American Family Physician*; 77:987–994

Wilcken B., (2003), „Ethical issues in newborn screening and the impact of new Technologies,“ *European Journal of Pediatrics*, 162:62–66.

Wilcken, B., Wiley, V., Hammond, J., Carpenter, K., (2003), “Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry,” *New England Journal of Medicine*, 3(348):2304–2312

Wilcken, B., Wiley, V., (2008), “Newborn screening,” *Pathology*, 40:104–15.

Wilcken, B., Haas, M., Joy, P., Wiley, V., Bowling, F., Carpenter, K., et al. (2009), “Expanded newborn screening: Outcome in screened and unscreened patients at age 6 years,” *Pediatrics*, 124:241–248

Wilcken, B., (2010), “Expanded newborn screening: Reducing harm, assessing benefit,” *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33:205–210

Wiley, V., Carpenter, K., Wilcken, B., (1999), Newborn screening with tandem mass spectrometry: 12 months' experience in NSW Australia,“ *Acta Paediatrica Supplement*, 88(432):48-51

Wilson, J.M.G., Jungner, Y.G., (1968), „Principles and practice of mass screening for disease.“ *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 65:281–393

Wilson, J.M.G., Jungner, Y.G., (1968), „Principles of screening for disease,“ Geneva: World Health Organization

Õunap, K., Lilleväli, H., Metspalu, A., Lipping-Sitska, M., (1998), „Development of the phenylketonuria screening programme in Estonia,“ *Journal of Medical Screening*, 5:22–23

Ziadeh, R., Hoffman, E.P., Finegold, D.N., Hoop, R.C., Brackett, J.C., Strauss, A.W., Naylor, E.W., (1995), Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Pennsylvania: neonatal screening shows high incidence and unexpected mutation frequencies,“ *Pediatric Research*, 37(5):675-8

Zytkovicz, T.H., Fitzgerald, E.F., Marsden, D., Larson, C.A., Shih, V.E., Johnson, D.M., Strauss, A.W., Comeau, A.M., Eaton, R.B., Grady, G.F., (2001), „Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program,“ *Clinical Chemistry*, 47(11):1945-55

Kasutatud veebiaadressid:

<http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=newbornscreening> (külastatud 13.04.15)

http://whqlibdoc.who.int/php/WHO_PHP_34.pdf (külastatud 13.04.15)

<http://mchb.hrsa.gov/programs/newbornscreening/screeningreport.html> (külastatud 19.04.15)

<http://newbornbloodspot.screening.nhs.uk/imd> (külastatud 21.04.15)

<http://www.novorozeneckyscreening.cz/en/for-the-public> (külastatud 25.04.15)

<http://ldmp.upol.cz/newborns.php> (külastatud 25.04.15)

<http://www.census.gov/population/international/data/idb/rank.php> (külastatud 20.04.15)

<https://www.haigekassa.ee/et/partnerile/raviasutusele/tervishoiuteenuste-loetelu>

<http://www.chromsystems.com>

<http://www.clir-r4s.org/Default.aspx>

www.omim.org

Sõeltestitavad ainevahetushaigused, esinemissagedused ja analüüsitavad metaboliidid

| Ainevahetushaigused | Lühend | OMIM | Sagedus | Metaboliidid | Olulised metaboliitide suhted |
|---|--------|--------|------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Aminoatsiduurid | | | | | |
| | | | 1:10000 | | |
| Fenüülketonuuria | PKU | 261600 | (1:6010)* | ↑ Phe | ↑ Phe/Tyr |
| Vahtrasiirupi tõbi | MSUD | 248600 | 1:200000 | ↑ Val; ↑ Leu | ↑ Leu/Phe, ↑ Leu/Ala |
| Türosineemia tüüp I | TYR I | 276700 | 1:100000 | ↑ SucA (↑ Tyr) | ↑ Tyr/Cit |
| Homotsüstinuuria | HCU | 236200 | 1:150000 | ↑ Met | ↑ Met/Phe |
| Arginineemia | ARG | 207800 | 1:350000 | ↑ Arg | ↑ Arg/Orn |
| Tsitruulliineemia tüüp I | CIT | 215700 | 1:60000 | ↑ Cit; ↑ Arg | ↑ Cit/Arg |
| Orgaanilised atsiduurid | | | | | |
| Isovaleraatatsiduuria | IVA | 243500 | 1:100000 | ↑ C5 | ↑ C5/C0; ↑ C5/2; ↑ C5/3 |
| | | 251000 | | | |
| Metüülmalonaatatsiduuria | MMA | 251110 | 1:75000 | ↑ C3 | ↑ C3/C2; ↑ C3/C16 |
| Vitamiin B12 puudulikkus | | | | ↑ C3 | C3/C2; C3/Met C3/C16 |
| Propionaatatsiduuria | PPA | 606054 | 1:75000 | ↑ C3 | ↑ C3/C2; ↑ C3/C16 |
| Glutaaratsiduuria tüüp I | GA I | 231670 | 1:50000 | ↑ C5DC | ↑ C5DC/C3; ↑ C5DC/C2 |
| Glutaaratsiduuria tüüp II | GA II | 231680 | 1:200000 | ↑ C5DC; ↑ C4; ↑ C5; ↑ C5OH | |
| Rasvhapete ainevahetushäired | | | | | |
| Keskmise ahelaga atsüül-CoA puudulikkus | MCAD | 201450 | 1:15000 | ↑ C6; ↑ C8; ↑ C10 | ↑ C8/C10; ↑ C8/C0 |
| | | | 1:75000 | | |
| Pika ahelaga hüdroksü-CoA puudulikkus | LCHAD | 609016 | (1:94864)* | ↑ C16OH; ↑ C18OH; ↑ C18:1OH | ↑ C16OH/C16 |
| Väga pika ahelaga atsüül-CoA puudulikkus | VLCAD | 201475 | 1:75000 | ↑ C14:1; ↑ C14; ↑ C14:2 | ↑ C14:1/C16 |
| Karnitiini transporteri defitsiit | CUD | 212140 | 1:75000 | ↑ C0; ↓ C16; ↓ C18 | |
| Karnitiini-atsüülkarnitiini translokaasi puudulikkus | CACT | 212138 | 1:1000000 | ↑ C16; ↑ C18:1 ↑ C18; ↑ C18:2 | ↑ C0/(C16+C18) |
| Karnitiini palmitoüültransferaasi I puudulikkus | CPT I | 255120 | 1:1000000 | ↑ C0; ↓ C16; ↓ C18 | ↑ C0/(C16+C18) |
| Karnitiini palmitoüültransferaasi II puudulikkus | CPT II | 255110 | 1:1000000 | ↑ C16; ↑ C18; ↑ C18:1; ↑ C18:2 | ↑ C0/(C16+C18) |
| Poolpaksult on toodud muutused, mis peavad esinema | | | | | |
| Esinemissagedused Garg ja Dasouki, 2006 | | | | | |
| *Esinemissagedus Eestis: Õunap <i>et al.</i> , 1998; Joost <i>et al.</i> , 2012 | | | | | |
| Metaboliidid Lehotay <i>et al.</i> , 2011 | | | | | |

Lisa 1

Tabel 1. Aminohapete sisemise kontrolli proovide Level 1 ja Level 2 karakteristikute arvutustulemused.

LEVEL 1

| | Gly | Pro | Orn | SucA | Cit | Arg | Ala | Val | Leu | Met | Phe | Tyr | Asp | Glu |
|------------------------------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Tegelik (μmol/L) | 467.00 | 547.00 | 292.00 | 2.39 | 83.00 | 96.00 | 423.00 | 219.00 | 276.00 | 55.00 | 160.00 | 178.00 | 199.00 | 429.00 |
| Keskmine (μmol/L) | 400.47 | 532.34 | 230.00 | 1.70 | 61.68 | 84.85 | 439.25 | 208.09 | 260.94 | 45.77 | 171.00 | 175.78 | 180.41 | 426.25 |
| Saagis (%) | 85.75 | 97.32 | 78.77 | 71.06 | 74.31 | 88.38 | 103.84 | 95.02 | 94.54 | 83.22 | 106.88 | 98.75 | 90.66 | 99.36 |
| stdv | 22.21 | 36.85 | 16.74 | 0.22 | 3.35 | 5.97 | 34.35 | 15.74 | 15.85 | 6.76 | 9.32 | 9.17 | 12.88 | 30.44 |
| stdv (%) | 5.55 | 6.92 | 7.28 | 13.00 | 5.43 | 7.03 | 7.82 | 7.56 | 6.07 | 14.77 | 5.45 | 5.22 | 7.14 | 7.14 |
| Chromsystems stdv (%) | 5.80 | 7.00 | 7.30 | 7.60 | 6.40 | 6.60 | 7.00 | 7.80 | 6.90 | 7.70 | 6.80 | 6.30 | 7.30 | 7.60 |
| stdv erinevus | 0.25 | 0.08 | 0.02 | -5.40 | 0.97 | -0.43 | -0.82 | 0.24 | 0.83 | -7.07 | 1.35 | 1.08 | 0.16 | 0.46 |

LEVEL 2

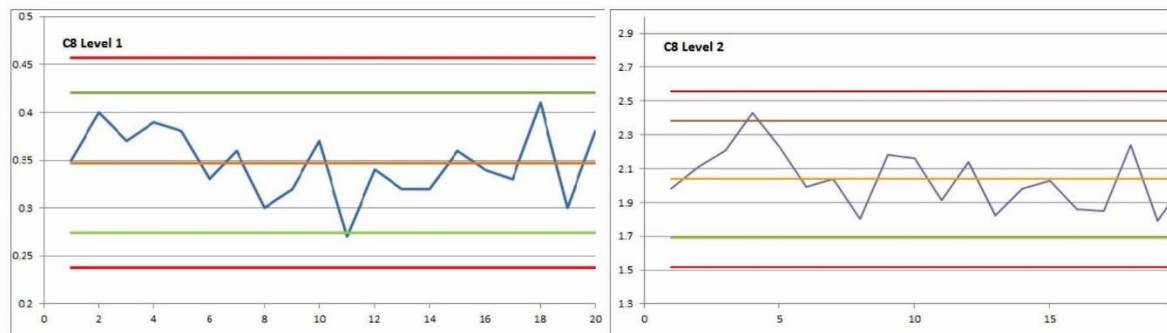
| | Gly | Pro | Orn | SucA | Cit | Arg | Ala | Val | Leu | Met | Phe | Tyr | Asp | Glu |
|-----------------------------|---------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tegelik (μmol/L) | 1253.00 | 827.00 | 737.00 | 8.43 | 331.00 | 225.00 | 791.00 | 455.00 | 582.00 | 225.00 | 501.00 | 560.00 | 364.00 | 840.00 |
| Keskmine (μmol/L) | 1125.13 | 830.90 | 599.17 | 7.16 | 249.77 | 187.37 | 842.43 | 429.33 | 558.97 | 169.30 | 556.33 | 574.63 | 352.80 | 857.40 |
| Saagis (%) | 89.80 | 100.47 | 81.30 | 84.90 | 75.46 | 83.27 | 106.50 | 94.36 | 96.04 | 75.24 | 111.04 | 102.61 | 96.92 | 102.07 |
| stdv | 78.96 | 64.05 | 51.07 | 0.92 | 16.47 | 15.22 | 62.99 | 35.29 | 36.26 | 23.77 | 39.76 | 46.30 | 25.78 | 58.02 |
| stdv (%) | 7.02 | 7.71 | 8.52 | 12.85 | 6.60 | 8.12 | 7.48 | 8.22 | 6.49 | 14.04 | 7.15 | 8.06 | 7.31 | 6.77 |
| Chromsystem stdv (%) | 8.90 | 8.80 | 6.40 | 7.40 | 7.40 | 7.70 | 9.00 | 8.00 | 9.20 | 8.70 | 8.60 | 8.20 | 8.30 | 8.30 |
| stdv erinevus | 1.88 | 1.09 | -2.12 | -5.45 | 0.80 | -0.42 | 1.52 | -0.22 | 2.71 | -5.34 | 1.45 | 0.14 | 0.99 | 1.53 |

Tabel 2. Atsüülkarnitiinide sisemise kontrolli proovide Level 1 ja Level 2 karakteristikute arvutustulemused.

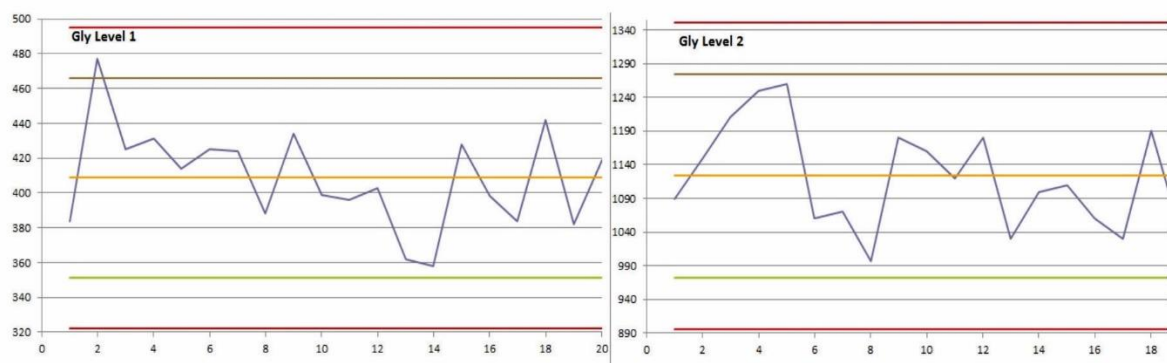
| LEVEL 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|---------|--------|--------|---------|---------|--------|-------|
| | C0 | C2 | C3 | C3DC | C4 | C4DC | C4OH | C5 | C5:1 | C5OH | C6 | C8 | C8:1 | C10 | C10:1 | C5DC | C12 | C14 | C14:1 | C14:2 | C14:0H | C16 | C16:1 | C16:1OH | C16OH | C18:1 | C18:1OH | C18:2OH | C18OH | C18 |
| Tegelik (µmol/L) | 43.30 | 29.10 | 5.02 | ND | 0.98 | ND | ND | 0.55 | ND | ND | 0.52 | 0.48 | ND | 0.45 | ND | 0.54 | 0.52 | 0.51 | ND | ND | ND | 4.45 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 2.41 |
| Keskmine (µmol/L) | 37.17 | 26.74 | 4.43 | 0.02 | 0.75 | 0.45 | 0.03 | 0.44 | 0.01 | 0.13 | 0.38 | 0.34 | 0.02 | 0.35 | 0.01 | 0.44 | 0.57 | 0.48 | 0.03 | 0.01 | 0.01 | 4.17 | 0.02 | 0.03 | 0.02 | 0.44 | 0.05 | 0.06 | 0.01 | 2.16 |
| Saagis (%) | 85.85 | 91.90 | 88.28 | 100.00 | 77.01 | 100.00 | 100.00 | 80.17 | 100.00 | 100.00 | 73.80 | 70.12 | 100.00 | 77.57 | 100.00 | 82.12 | 109.44 | 93.75 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 93.72 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 89.63 |
| stdv | 1.93 | 1.61 | 0.28 | 0.01 | 0.06 | 0.05 | 0.01 | 0.05 | 0.00 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.01 | 0.04 | 0.00 | 0.06 | 0.11 | 0.06 | 0.01 | 0.00 | 0.00 | 0.24 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.06 | 0.05 | 0.04 | 0.00 | 0.22 |
| stdv (%) | 5.20 | 6.02 | 6.35 | 57.01 | 8.03 | 10.62 | 43.06 | 11.23 | 33.73 | 22.20 | 9.07 | 10.17 | 46.31 | 10.09 | 34.02 | 13.43 | 19.60 | 12.70 | 44.73 | 0.00 | 24.25 | 5.72 | 46.37 | 32.22 | 47.44 | 13.89 | 103.73 | 59.35 | 37.95 | 10.23 |
| Chromsystems stdv (%) | 9.00 | 8.90 | 13.60 | ND | 16.90 | ND | ND | 17.20 | ND | ND | 22.00 | 18.60 | ND | 16.40 | ND | 25.20 | 22.00 | 17.90 | ND | ND | ND | 12.80 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 10.90 |
| stdv erinevus | 3.80 | 2.88 | 7.25 | ND | 8.87 | ND | ND | 5.97 | ND | ND | 12.93 | 8.43 | ND | 6.31 | ND | 11.77 | 2.40 | 5.20 | ND | ND | ND | 7.08 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.67 |

| LEVEL 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|--------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|---------|--------|--------|---------|---------|--------|-------|
| | C0 | C2 | C3 | C3DC | C4 | C4DC | C4OH | C5 | C5:1 | C5OH | C6 | C8 | C8:1 | C10 | C10:1 | C5DC | C12 | C14 | C14:1 | C14:2 | C14:0H | C16 | C16:1 | C16:1OH | C16OH | C18:1 | C18:1OH | C18:2OH | C18OH | C18 |
| Tegelik (µmol/L) | 120.00 | 77.00 | 14.20 | ND | 4.68 | ND | ND | 2.40 | ND | ND | 2.26 | 2.34 | ND | 2.34 | ND | 2.40 | 2.40 | 2.34 | ND | ND | ND | 12.90 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 9.33 |
| Keskmine (µmol/L) | 107.76 | 73.51 | 13.77 | 0.06 | 4.06 | 0.53 | 0.08 | 2.17 | 0.01 | 0.15 | 2.12 | 2.03 | 0.05 | 1.96 | 0.02 | 2.29 | 2.60 | 2.32 | 0.06 | 0.01 | 0.01 | 12.64 | 0.05 | 0.07 | 0.04 | 0.90 | 0.12 | 0.08 | 0.03 | 8.59 |
| Saagis (%) | 89.80 | 95.47 | 96.97 | 100.00 | 86.79 | 100.00 | 100.00 | 90.42 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 86.79 | 100.00 | 83.72 | 100.00 | 95.61 | 108.53 | 99.25 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 97.96 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 92.02 |
| stdv | 9.04 | 4.53 | 1.15 | 0.02 | 0.29 | 0.07 | 0.02 | 0.19 | 0.00 | 0.03 | 0.16 | 0.16 | 0.01 | 0.18 | 0.01 | 0.21 | 0.33 | 0.28 | 0.03 | 0.00 | 0.01 | 0.96 | 0.02 | 0.02 | 0.03 | 0.09 | 0.08 | 0.05 | 0.01 | 0.88 |
| stdv (%) | 8.39 | 6.17 | 8.36 | 37.63 | 7.10 | 12.74 | 24.54 | 8.89 | 31.37 | 20.26 | 7.40 | 7.81 | 26.78 | 9.22 | 47.72 | 9.36 | 12.57 | 11.90 | 46.88 | 33.40 | 41.15 | 7.57 | 35.77 | 31.64 | 65.59 | 9.75 | 70.66 | 60.44 | 54.99 | 10.26 |
| Chromsystem stdv (%) | 9.70 | 10.30 | 13.10 | ND | 14.90 | ND | ND | 13.50 | ND | ND | 19.00 | 16.50 | ND | 16.40 | ND | 18.00 | 14.80 | 28.10 | ND | ND | ND | 13.20 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 12.30 |
| stdv erinevus | 1.31 | 4.13 | 4.74 | ND | 7.80 | ND | ND | 4.61 | ND | ND | 11.60 | 8.69 | ND | 7.18 | ND | 8.64 | 2.23 | 16.20 | ND | ND | ND | 5.63 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 2.04 |

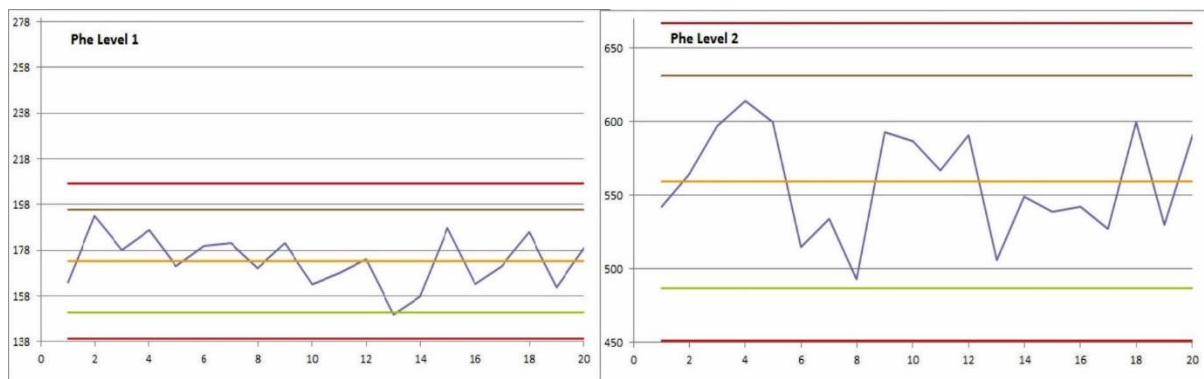
Sisemise kontrolli proovide X-kaardid



Joonis 1. C8 Level 1 ja Level 2 sisemise kontrolli proovide 20 analüüsi tulemused X-kaardil. Joonisel on märgitud keskmine väärtus (Level 1: 0,347 $\mu\text{mol/L}$ ja Level 2: 2.03 $\mu\text{mol/L}$). Rohelise joonega on tähistatud ± 2 stdv väärtus ja punasega ± 3 stdv. Sisemise kontrolli tulemused loeti usaldusväärseks, kui metaboliidi väärtus jääb ± 2 stdv piiresse.



Joonis 2. Gly Level 1 ja Level 2 sisemise kontrolli proovide 20 analüüsi tulemused X-kaardil. Joonisel on märgitud keskmine väärtus (Level 1: 408,65 $\mu\text{mol/L}$ ja Level 2: 1123.35 $\mu\text{mol/L}$). Rohelise joonega on tähistatud ± 2 stdv väärtus ja punasega ± 3 stdv. Sisemise kontrolli tulemused loeti usaldusväärseks, kui metaboliidi väärtus jääb ± 2 stdv piiresse.



Joonis 3. Phe Level 1 ja Level 2 sisemise kontrolli proovide 20 analüüsi tulemused X-kaardil. Joonisel on märgitud keskmine väärtus (Level 1: 173,35 µmol/L ja Level 2: 559,05 µmol/L). Rohelise joonega on tähistatud ± 2 stdv väärtus ja punasega ± 3 stdv. Sisemise kontrolli tulemused loeti usaldusväärseks, kui metaboliidi väärtus jääb ± 2 stdv piiresse.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Ursula Ilo,

(sünnikuupäev: 30.09.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Vastsündinute laiendatud skriining kaasasündinud ainevahetushaiguste suhtes tandem mass-spektromeetria meetodil“

mille juhendajad on Katrin Õunap, Kadi Künnapas, Karit Reinson, Neeme Tõnisson,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015